

00562  
6  
1a

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética  
y Biotecnología

PROPIEDADES QUE DEFINEN AL TRH EXTRAHIPOTALAMICO COMO  
POSIBLE NEUROMODULADOR EN EL SISTEMA  
NERVIOSO DE RATA

TESIS

que para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Químicas (Bioquímica)

Presenta la Bióloga

HILAGRUS HENDEZ UBACH

Facultad de Química, U.N.A.M.

Abril 1986

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN.

Dado que la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH : pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) es un péptido que se encuentra ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos, que se encuentra localizado en terminales nerviosas, que posee receptores de alta afinidad en las regiones en que el péptido se encuentra concentrado, y que exhibe tanto efectos neuroquímicos como electrofisiológicos y sobre el comportamiento, se ha postulado que además de su función endócrina en el eje hipotalámico-hipofisiario, pudiera funcionar como neurotransmisor o neuromodulador en algunas áreas del SNC. Si bien se sabe que el péptido se encuentra en altas concentraciones en áreas extrahipotalámicas, no se conocen las propiedades del TRH en procesos de compartimentalización y liberación del péptido endógeno en estas áreas, por lo que el objetivo de este trabajo es establecer si las regiones cerebrales que contienen el péptido son capaces de liberarlo en respuesta a una depolarización inducida por altas concentraciones de KCl. Para esto, regiones enteras o rebanadas de 250  $\mu$  de grosor de cerebro de rata se incubaron *in vitro* en un medio fisiológico Krebs-Ringer-Bicarbonato y se estimularon con dosis depolarizantes de KCl. El TRH liberado al medio, tanto en condición basal como estimulada por 56 mM KCl, se cuantificó por radioinmunoensayo (RIA). Observamos una amplia variabilidad en la liberación basal de TRH en las áreas estudiadas, que va desde el 1 al 20 % de TRH liberado en relación al contenido total de péptido en el tejido después de la incubación. En cuanto a la liberación estimulada, de 20 regiones estudiadas sólo se observó efecto significativo de 56 mM KCl en la eminencia media, el área preóptica, el hipotálamo, el núcleo accumbens, la amígdala, el mesencéfalo, la médula oblongada y la médula espinal (cervical), áreas cerebrales que poseen una gran cantidad de TRH, de receptores al péptido, una alta densidad de terminales TRH-érgicas y en las que se han descrito efectos específicos del TRH. Por otra parte, no observamos correlación entre los niveles endógenos del péptido y la habilidad para liberarlo al medio en las áreas estudiadas. Estos resultados indican que existe una distribución diferencial de la liberación de TRH en el cerebro de rata y sugieren que probablemente existen diferentes pozas liberables del péptido. Los resultados apoyan la hipótesis de TRH como posible neuromodulador en algunas regiones del SNC de rata.

Por otra parte, con el fin de establecer la identidad de la(s) molécula(s) liberada(s) de rebanadas de hipotálamo en estas condiciones, con TRH auténtico, los medios de incubación (basal y estimulado) se sometieron a cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplada a RIA. Observamos que la mayor parte de la inmunoreactividad endógena del hipotálamo y la liberada en estas condiciones corresponde a TRH auténtico. Sin embargo, en los medios de incubación detectamos dos moléculas adicionales a TRH, más hidrofóbicas que éste, que cruzan con el anticuerpo anti-TRH. Se hacen proposiciones sobre la probable naturaleza de estas dos sustancias inmunoreactivas : 1) intermediarios del procesamiento del precursor de TRH; 2) moléculas diferentes a TRH que cruzan con el anticuerpo anti-TRH; y 3) moléculas de TRH modificadas extracelularmente una vez que el péptido ha sido liberado al espacio sináptico.

## ABSTRACT.

To increase our knowledge of the TRH functions in brain and the processes of compartmentalization and release, we studied the in vitro release of endogenous TRH in different brain areas. We also determined the correlation between TRH levels and release under both basal and stimulated conditions. TRH concentration was measured in tissues and media (basal and 56 mM KCl) by specific radioimmunoassay (RIA). Different brain regions showed high variability in the basal release of TRH (1 - 20 % of tissue content). This suggests the existence of different pools. The response to depolarizing stimulus (56 mM KCl) was significant only in the following regions : median eminence, preoptic area, hypothalamus, nucleus accumbens, amygdala, mesencephalon, medulla oblongata and the cervical region of the spinal cord. These regions have been shown to contain a high number of receptors, a high concentration of TRH nerve endings and are susceptible to TRH effects. These results support the hypothesis that TRH functions as neuromodulator in these areas.

To analyse the identity of TRH immunoreactivity, we studied both the immunological and chromatographic pattern of endogenous TRH as well as that of the material released from the hypothalamus by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and RIA. TRH-like material detected in hypothalamic incubates (basal and K<sup>+</sup>-stimulated) and in tissue were shown to be immunologically and chromatographically identical to synthetic TRH. However, in hypothalamic incubates we found two other TRH-like immunoreactive molecules, more hydrophobic than TRH. We consider 3 hypothesis to explain the possible nature of these two molecules : 1) intermediaries in the processing of the TRH precursor; 2) different molecules that cross-react with the TRH antibody; and 3) TRH molecules modified in the extracellular space.

# I N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	2
- Distribución Regional de TRH .....	6
- Caracterización Química del TRH Immunoreactivo .....	11
- Síntesis del TRH .....	13
- Localización Subcelular y Liberación del TRH .....	14
- Mecanismos de Inactivación del TRH .....	15
1. Degradación Enzimática .....	17
2. Recaptura .....	20
- Receptores a TRH .....	21
- Efectos del TRH en el Sistema Nervioso Central .....	24
OBJETIVOS Y METAS .....	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	31
MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
- Materiales .....	32
- Preparación de $^{35}$ S-TRH .....	33
- Preparación de Liberoles .....	35
- Extracción de TRH .....	39
A. Pellets de Incubación .....	39
B. Tejidos .....	48
C. Cultivo en Organosoma de TRH .....	48
1. Caracterización del sustrato para TRH ( $R_2$ ) .....	48
2. Liberación del sustrato .....	48
3. Liberación de TRH en presencia de $R_2$ y TRH .....	50
4. Efecto de los inhibidores .....	52
D. Liberación de TRH en Cultivos .....	54
E. Caracterización de la quila de los cultivos .....	55
F. Liberación en Cultivos de Tejidos Cultivos .....	56
G. Estadística .....	57
RESULTADOS .....	58
- Distribución Regional de TRH en el Cerebro de Rata .....	58
- Liberación de TRH Endógeno de Hipocampo de Rata .....	60
- Liberación Regional de TRH Endógeno de Cerebro de Rata .....	66
1. Liberación de TRH .....	66
2. Liberación de TRH Exógena por la $R_2$ .....	68
- Efectos de Liberación de TRH en Médula Espinal de Rata .....	74
- Caracterización del Material Liberado en Cultivo de Rata .....	77
DISCUSIÓN .....	102
REFERENCIAS .....	118
APÉNDICE .....	129
AGRADECIMIENTOS .....	131

## INTRODUCCION.

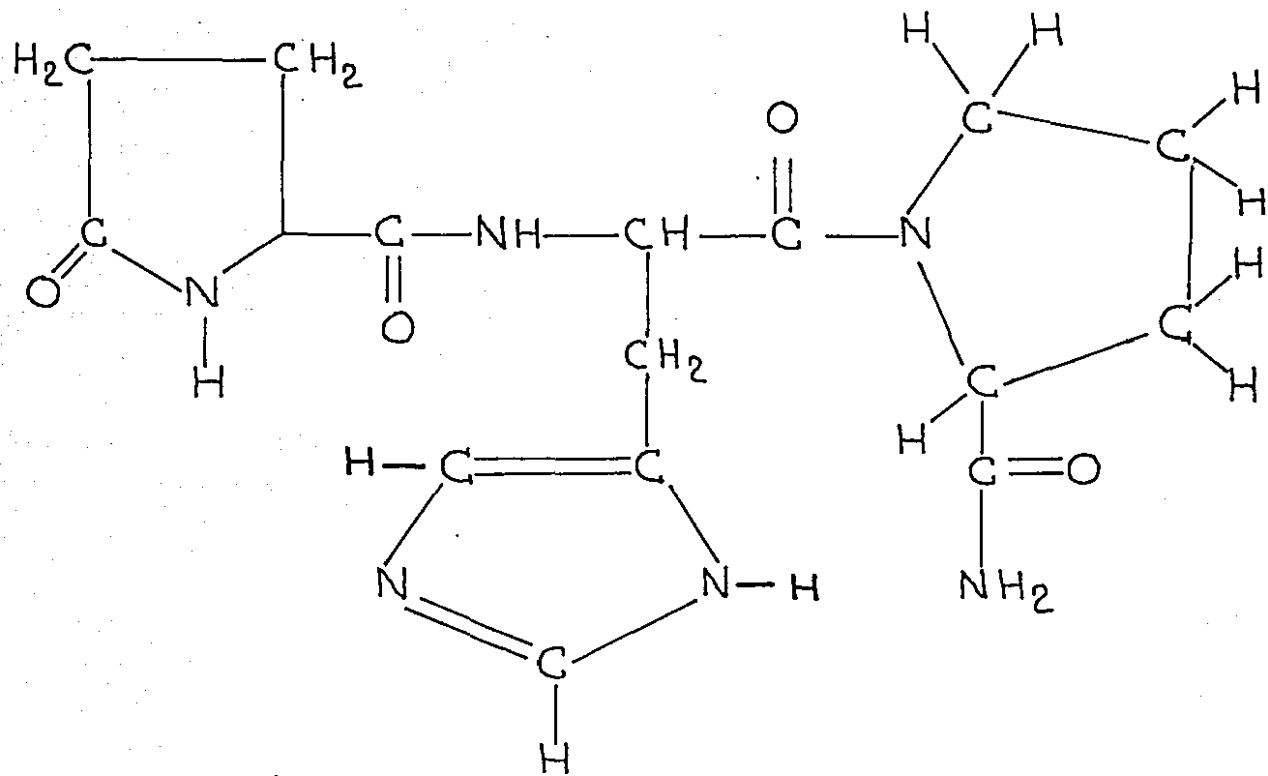
Dado que la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH : pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) se encuentra ampliamente distribuida en el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos y debido a los efectos que este péptido exhibe en algunas áreas del mismo, se ha postulado que, además de su acción endócrina en el eje hipotalámico-hipofisario, pudiera funcionar como neurotransmisor o neuromodulador en áreas extrahipotalámicas. Si bien se sabe que el péptido se encuentra en altas concentraciones en estas áreas, se conoce muy poco acerca del mecanismo de liberación del TRH en regiones extrahipotalámicas.

En este trabajo se presentan los resultados de un estudio regional de liberación de TRH endógeno en el cerebro de rata y la caracterización química de la(s) molécula(s) liberada(s) de rebanadas de hipotálamo por métodos cromatográficos.

## ANTECEDENTES.

La Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) es un tripéptido con ambas terminales bloqueadas (Fig. 1), de secuencia pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>, que inicialmente fue aislado de homogenados de hipotálamo de ovino (Schally et al., 1969; Boler et al., 1969) y de bovino (Burgus et al., 1970), y que fue caracterizado por su acción hormonal en el eje hipotalámico-hipofisario. El péptido es liberado del hipotálamo de la eminencia media al sistema portal hipotalámico-hipofisario (Fig. 2) y es transportado hasta la adenohipófisis, en donde, por una interacción con receptores de membrana plasmática específicos y de alta afinidad (Labrie et al., 1972; Wilber y Seibel, 1973), estimula la liberación de Tirotropina (TSH : Hormona Estimulante de la Tiroides) por los tirotropos (Fraser y McNeilly, 1982; Fink et al., 1983) y de prolactina por los lactotropos (Tashjian et al., 1971; Grosvenor y Hena, 1980). Las hormonas adenohipofisarias son secretadas a la circulación general, a través de la cual alcanzan el órgano blanco correspondiente. La TSH estimula la liberación de Triiodotironina (T<sub>3</sub>) y de Tiroxina (T<sub>4</sub>) por la tiroides (Dumont y Lamy, 1980), hormonas que a su vez afectan diversos procesos metabólicos.

Diversos autores han mostrado que la estructura primaria del tripéptido es esencial en la actividad biológica. Cambios en la posición piróglo disminuyen considerablemente la potencia del TRH. Sustituciones en el anillo de histidina muestran que la actividad biológica del péptido depende de la aromaticidad y de ciertas restricciones en la libertad de rotación del anillo imidazol (Silvertsson et al., 1972). Otros estudios han demostrado que la amida



(piv) glutamil - histidil - prolimamida

Fig. 1. — ESTRUCTURA DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)



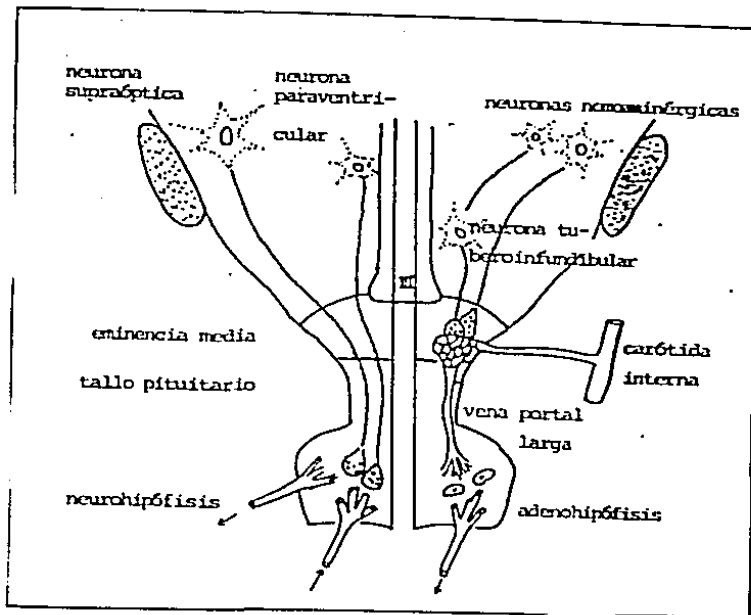


Fig. 2.- Diagrama del Eje Hipotalámico-Hipofisiario.

Izquierda - Sistema Hipotalámico-Neurohipofisiario : los axones de los núcleos supraóptico y paraventricular terminan sobre los vasos sanguíneos de la neurohipófisis.

Derecha - Sistema Hipotalámico-Adenohipofisiario : las terminales de las neuronas tuberoinfundibulares terminan sobre el plexo capilar de la eminencia media.

terciaria de la prolina es esencial para la acción de la hormona (Grant et al., 1973; Vale et al., 1973).

Una vez determinada la estructura del TRH fue posible sintetizar químicamente el péptido y utilizarlo en ensayos biológicos. De esta manera se mostró que el TRH sintético tiene los mismos efectos que el TRH hipotalámico sobre la adenohipófisis en todas las especies de mamíferos estudiadas, sin importar la vía de administración, el sexo o la edad. La administración de TRH produce un aumento en los niveles sanguíneos de TSH, así como en los niveles de  $T_3$  y  $T_4$  (Fleischer et al., 1972).

La liberación de TRH del hipotálamo es inhibida tanto in vitro como in vivo por somatostatina, péptido que se encuentra en altas concentraciones en el hipotálamo (Schally et al., 1978). Además, la somatostatina inhibe también la secreción de TSH estimulada por TRH a nivel adenohipofisiario (Ridgway et al., 1983). Por otra parte, la secreción de TSH y prolactina de la adenohipófisis es regulada por las hormonas tiroideas  $T_3$  y  $T_4$  a través de un mecanismo de retroalimentación negativo. Estas hormonas parecen regular el número de receptores a TRH en los tirotropos (Hinkle et al., 1981; Padmanabhan et al., 1981), disminuyendo de esta forma la secreción de TSH a la circulación. Existe la posibilidad de que las hormonas tiroideas puedan regular también la liberación de TRH a nivel hipotalámico (Jackson y Lechan, 1983). Por otro lado, se desconoce si las hormonas adenohipofisarias pueden controlar la liberación de TRH in vivo a través de un flujo retrógrado hacia el hipotálamo por el sistema portal hipotalámico-hipofisiario.

### Distribución Regional de TRH.

A partir del conocimiento de la estructura del TRH ha sido posible desarrollar anticuerpos específicos que han permitido medir los niveles de TRH presentes tanto en núcleos hipotalámicos como en áreas extrahipotalámicas por medio de la técnica de radioinmunoensayo (RIA). Además, la aplicación de las técnicas de inmunohistoquímica ha permitido determinar la localización de neuronas TRH-érgicas en diversas regiones del cerebro. La cuantificación por RIA ha mostrado que la concentración más elevada de TRH se encuentra en el hipotálamo, pero se presentan también concentraciones apreciables en otras áreas del cerebro, tales como el cerebro anterior, el tallo cerebral y el diencefalo posterior (Brownstein et al., 1974). El TRH hipotalámico representa sólo el 31 % del TRH total medido en el cerebro; la médula espinal y el diencefalo posterior poseen concentraciones intermedias, y el cerebelo sólo representa el 2 % del total en el cerebro (Winokur y Utiger, 1974). Winokur y Utiger (1974) y Oliver et al. (1974) han mostrado que el contenido de TRH total en el cerebro de rata es de aproximadamente 16,800 pg y 18,200 pg, respectivamente, mientras que Jackson y Reichlin (1979) han reportado que la cantidad de TRH extrahipotalámico alcanza niveles de 18,900 pg. En la tabla 1 se muestran los niveles de TRH detectados por RIA en diversas áreas del Sistema Nervioso Central (SNC) de rata, determinados por varios autores. En el hipotálamo, la concentración más elevada de TRH se presenta en la eminencia media, seguida de la parte media del núcleo ventromedial (Brownstein et al., 1974; Kizer et al., 1976).

Además, este péptido también ha sido detectado en el tracto intestinal, en líquido cerebroespinal y en piel de anfibios, y en

Tabla 1.- Distribución Regional de TRH en el Sistema Nervioso Central de Rata.

Región	Contenido Total ( pg )	pg TRH / mg tejido húmedo	Referencia
Hipotálamo	4 100 ± 200	129 ± 7	Winokur y Utiger (1974)
	3 425 ± 268		Oliver et al. (1974)
	8 200 ± 700		Bassiri y Utiger (1974)
	3 200	59 - 84	Jeffcoate y White (1975)
	9 400 ± 500	400	Jackson y Reichlin (1979)
	5 220 ± 350		Joseph-Bravo et al. (1979)
		e.c. 125 ± 13	e.p. 465 ± 25
Eminencia media	890		Brownstein et al. (1974)
	912 ± 121		Yamauchi (1980)
	757 ± 126		Lechan et al. (1983)
Area preóptica		108 ± 16	Brownstein et al. (1974)
		167 ± 10	Chen y Ramirez (1981)
Neurohipófisis	77 ± 20	70 ± 16	Oliver et al. (1974)
		240	Jackson y Reichlin (1979)
	142 ± 39	89 ± 12	Chen y Ramirez (1981)
Lóbulo olfatorio		5 - 8	Jackson y Reichlin (1979)
		23.1 ± 2.2	Chen y Ramirez (1981)
		60 ± 10	Kreider et al. (1982)

Médula espinal total	18 700 ± 700	42 ± 2 7.5 ± 1.2 a 59 ± 3.7	Kardon et al. (1977) Harkness y Brownfield (1985)
C <sub>8</sub> - coccyx	777.6 ± 26.4		Lechan et al. (1983)
C <sub>8</sub> - T <sub>1</sub> T <sub>7</sub> - T <sub>8</sub> T <sub>12</sub> - S <sub>3</sub>		> 40	Harkness y Brownfield (1985)
C <sub>2</sub> - C <sub>7</sub>		< 10	Harkness y Brownfield (1985)
Tallo Cerebral total	3 390 ± 183 2 100 ± 100	12 ± 0.5 12 ± 2 4 - 5	Oliver et al. (1974) Winokur y Utiger (1979) Jackson y Reichlin (1979)
Puente		15 ± 3	Oliver et al. (1974)
Médula oblongada		19 ± 3	Oliver et al. (1974)
Amígdala		23 ± 3	Winokur y Utiger (1974)
Estriado		5.3 ± 1.2	Spindel et al. (1981)
Adenohipófisis	16.5 ± 3.2 64 ± 5	2.2 ± 0.45 8 - 11 n.d. 22.1 ± 1.6	Oliver et al. (1974) Jackson y Reichlin (1979) Yamauchi (1980) Chen y Ramirez (1981)
Corteza cerebral total		3 < 5 1 - 3 n.d.	Winokur y Utiger (1974) Youngblood et al (1978) Jackson y Reichlin (1979) Yamauchi (1980)

Corteza cerebral anterior	1 300	5	Winokur y Utiger (1974)
Corteza cerebral posterior	1 300 ± 100	2 ± 0.1	Winokur y Utiger (1974)
Glándula pineal		n.d.	Yamauchi (1980)
Retina		5 - 15	Schaeffer et al. (1977b)
	800 pg/ojo		Youngblood et al. (1979)
	< 2.2 pg/ojo	< 0.1	Eskay et al. (1980)
	298 ± 18.4	1.2 ± 0.06 2.0 ± 0.2	Oliver et al. (1974) Brownstein et al. (1974)
Cerebelo		0.97	Jeffcoate y White (1975)
total	260 ± 30	1 ± 0.1	Winokur y Utiger (1979)
		1 - 3	Jackson y Reichlin (1979)
		1.05 ± 0.08	Chen y Ramirez (1981)
		e.c. 3.4 ± 0.8	Pacheco et al. (1981a)
		e.p. 145 ± 5	
Hemisferios cerebelares		< 2	Pacheco et al. (1981a)
Vermis cerebelar		< 2	Pacheco et al. (1981a)

En el caso de la médula espinal se tomaron los segmentos correspondientes a las vértebras cervicales, torácicas y sacras. El subíndice indica el número de vértebra que limita el segmento. C = cervical, T = torácica, S = sacra.

e.c. = extracto crudo.

e.p. = extracto purificado.

n.d. = no detectado.

Los datos se expresan como la media ± error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ).

animales inferiores, en los cuales el TRH no tiene influencia sobre la función tiroidea (Jackson y Reichlin, 1974).

La amplia distribución del TRH en el SNC de mamíferos se ha confirmado por estudios de inmunohistoquímica. Se ha demostrado la presencia de cuerpos neuronales que contienen TRH en el hipotálamo y en la médula oblongada (Hokfelt et al., 1978; Lechan y Jackson, 1982; Johansson et al., 1983). En el hipotálamo, los somas de las células TRH-érgicas se encuentran en la porción parvocelular del núcleo paraventricular y en los núcleos preóptico, supraquiasmático, dorso-medial y perifornico, en el hipotálamo lateral y en la región preamilar (Palkovits, 1984). En la médula oblongada, la inmunoreactividad se ha identificado en somas neuronales de los núcleos de raphe (magnus, obscurus y pallidus), en coexistencia con Substancia P y serotonina (Johansson et al., 1981, 1983). Recientemente, Richter et al. (1984) han demostrado que en piel de anfibios existe un precursor proteico de alto peso molecular de este péptido. Lechan et al. (1985), basándose en la secuencia de aminoácidos deducida a partir del precursor de TRH de piel de anfibios, sintetizaron un anticuerpo contra el decaapéptido sintético Cys-Lys-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg-Cys (pro-TRH-SK ciclizado) y lo utilizaron en estudios de inmunohistoquímica en el cerebro de rata. Con este anticuerpo detectaron inmunoreactividad en somas neuronales en el hipotálamo, el área preóptica y el raphe medular, distribución que coincide con la reportada para TRH procesado (Lechan y Jackson, 1982). Además, pro-TRH inmunoreactivo se presenta en neuronas de las capas glomerular y plexiforme de los bulbos olfatorios, el complejo tardo-potamen, la amígdala, la sustancia gris central, los núcleos pontinos, el raphe dorsal, los núcleos cocleares, el nucleus

solitarius, el flocculus del cerebelo y en la capa II de la corteza cerebral (Lechan et al., 1985). Por otra parte, Harkness y Brownfield (1985) han mostrado la presencia de somas neuronales TRH-érgicos en la lámina II del asta dorsal y en la superficie de la lámina III a lo largo de toda la médula espinal.

La mayor concentración de fibras y terminales TRH-érgicas se encuentra en la eminencia media. La red TRH-érgica es relativamente densa en el hipotálamo y en el organum vasculosum de la lamina terminalis (OVLT) del área preóptica. Se han descrito axones y terminales TRH-érgicos en la amígdala, el núcleo septo-lateral, el tallo cerebral inferior, la médula espinal y la neurohipófisis (Lechan y Jackson, 1982; Palkovits, 1984; Harkness y Brownfield, 1985). En el tallo cerebral inferior, se encuentra TRH en altas concentraciones en los núcleos motores de los nervios craneales, especialmente en el nucleus tractus solitarius y el núcleo dorsal vagal (Palkovits, 1984). En la médula espinal, las terminales TRH-érgicas se encuentran en la sustancia gris central, la columna celular intermediolateral y el asta ventral (Palkovits, 1984; Harkness y Brownfield, 1985). Recientemente, Harkness y Brownfield (1985) han descrito fibras y terminales TRH-érgicas en el asta dorsal de la médula espinal, y han reportado la interacción de un sistema TRH-érgico con serotonina en el asta ventral y en la columna intermediolateral de la médula espinal.

#### Caracterización química del TRH inmunoreactivo.

Aunque el TRH se ha detectado por RIA e inmunohistoquímica en áreas cerebrales extrahipotalámicas, un gran número de investigadores se ha cuestionado acerca de la naturaleza química de este material



inmunoreactivo. Durante mucho tiempo existió una gran controversia sobre la autenticidad del TRH presente en tejidos extrahipotalámicos y en fluidos biológicos. Este problema ha sido abordado mediante el uso de varios métodos cromatográficos, entre los que se incluyen filtración en gel, cromatografía en capa fina, cromatografía de afinidad y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Mediante el uso de estas técnicas, diversos autores han llegado a la conclusión de que la inmunoreactividad detectada en el hipotálamo corresponde a TRH auténtico (Jeffcoate y White, 1975; Kreider et al., 1979; Jackson, 1980; Spindel y Wurtman, 1980; Sheward et al., 1983). En lo que se refiere al material inmunoreactivo extrahipotalámico, los grupos de Jeffcoate y White (1975) y de Youngblood et al. (1978, 1979) reportan que este no es TRH auténtico y que se observa una multiplicidad de picos inmunoreactivos en los cromatogramas, que corresponden a moléculas que cruzan con el anticuerpo anti-TRH. Sin embargo, actualmente la mayoría de los autores está de acuerdo en que el cerebro extrahipotalámico contiene TRH auténtico (Martino et al., 1979; Kreider et al., 1979, 1981; Spindel y Wurtman, 1980; Jackson, 1980; Parker, 1981; McErmott et al., 1981), y se ha argumentado que los resultados del grupo de Youngblood se deben a extracciones pobres del péptido, con bajas recuperaciones, y a interferencias de la sílica gel de las cromatografías en el RIA (Kreider et al., 1979). En el lóbulo olfatorio, Kreider et al. (1981) han detectado dos moléculas inmunoreactivas, una que corresponde a TRH auténtico y otra de alto peso molecular. Sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado este material. Por otra parte, Jackson (1980) ha encontrado que sólo el 56 % de la inmunoreactividad en médula espinal es recuperada después de una cromatografía de afinidad y HPLC, por lo que se sugiere

que al menos en esta región no todo el material detectado por RIA es TRH.

En fluidos biológicos la situación es diferente, ya que se han detectado varios picos inmunoreactivos por HPLC, de los cuales uno corresponde a TRH auténtico. Biggins et al. (1983) detectaron 4 picos inmunoreactivos en muestras de líquido cerebroespinal lumbar de humano; Youngblood et al. (1978) detectaron muchos picos inmunoreactivos en orina y suero humanos y en suero de rata; Pekary y Friedman (1983) observaron 2 picos inmunoreactivos en sémen humano fresco; y Sheward et al. (1983) detectaron 3 picos inmunoreactivos en sangre portal de rata. Es claro, por lo tanto, que al menos en fluidos biológicos existen diferentes moléculas inmunoreactivas además de TRH. Hasta el momento, ninguna de estas moléculas adicionales ha sido identificada.

#### Biosíntesis de TRH.

El TRH es sintetizado por vía ribosomal (McKelvy, 1977) como un precursor de alto peso molecular (Rupnow et al., 1979). El uso de las técnicas de ingeniería genética ha permitido obtener la secuencia del precursor del TRH de hipotálamo de rata, en el cual la secuencia del TRH se encuentra repetida 5 veces, flanqueada por residuos de lisina y arginina, que son los posibles sitios de ruptura del precursor (Lechan et al., 1986). Recientemente se han logrado localizar por inmunohistoquímica (con un anticuerpo contra el decapeptido sintético pro-TRH-SH ciclizado) los somas neuronales que contienen el precursor del TRH en diversas áreas del cerebro de rata (Lechan et al., 1985), lo que confirma que la biosíntesis del TRH en el SNC de mamíferos

ocurre por ruptura post-traducciona! de un precursor proteico más grande y que el procesamiento de la pro-hormona se lleva a cabo principalmente en el cuerpo celular de estas neuronas.

#### Localización Subcelular y Liberación del TRH.

Las técnicas de fraccionamiento subcelular han mostrado que más del 50 % del TRH hipotalámico y extrahipotalámico se localiza subcelularmente en terminales nerviosas, y dentro de éstas en vesículas sinápticas (Barnea et al., 1976; Winokur et al., 1977). El TRH almacenado en terminales nerviosas en el hipotálamo es liberado por un mecanismo dependiente de calcio, probablemente por exocitosis, en respuesta a estímulos depolarizantes (Joseph-Bravo et al., 1979; Hageda y Frohman, 1980; Warberg, 1982), así como en respuesta a ciertos neurotransmisores (Charli et al., 1978; Joseph-Bravo et al., 1979; Chen y Ramirez, 1981; Biggins et al., 1983). Los estudios de liberación de TRH endógeno se han llevado a cabo tanto en sistemas de incubación in vitro estáticos como utilizando diversos sistemas de perfusión del tejido. Así mismo, se han utilizado varias preparaciones, que incluyen sinaptosomas, fragmentos y rebanadas de tejido, y cultivo de neuronas. Cuando se incuban de manera estática sinaptosomas de hipotálamo de rata en medio fisiológico (Krebs-Ringer-Bicarbonato) en presencia de calcio, no se observa un aumento en la liberación de TRH en respuesta a 56 mM KCl (Bennett et al., 1975; Joseph-Bravo et al., 1979; Warberg, 1982). Sólo cuando los sinaptosomas son incubados en sacarosa es posible observar un aumento en los niveles de TRH liberados en respuesta a 56 mM KCl (Joseph-Bravo et al., 1979; Warberg, 1982). Sólo un grupo ha reportado una respuesta a altas concentraciones de potasio al incubar sinaptosomas en medio

fisiológico (Schaeffer et al., 1977a). Esta controversia existe también para otros factores de liberación, como LHRH (Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante) y somatostatina (Bennett et al., 1975; Warberg, 1982). Por lo tanto, los resultados obtenidos en sinaptosomas no parecen ser del todo confiables.

Por otra parte, la incubación estática de fragmentos o rebanadas de hipotálamo mediobasal o la superfusión continua de fragmentos hipotalámicos, resulta en un aumento en la liberación de TRH al medio en respuesta a una alta concentración de potasio, en forma dependiente de calcio (Charli et al., 1978; Joseph-Bravo et al., 1979; Maeda y Frohman, 1980; Chen y Ramirez, 1981; Tapia-Arancibia et al., 1984). El efecto de varios neurotransmisores sobre la liberación de TRH ha sido estudiado en estos sistemas. Sin embargo, existe una gran controversia acerca de los efectos producidos por varios neurotransmisores, ya que diversos grupos de investigadores han reportado efectos diferentes para un mismo neurotransmisor, dependiendo del sistema de incubación y de la preparación utilizados (Tabla 2). En general, se ha propuesto que la liberación de TRH del hipotálamo medio basal es controlada por fibras excitatorias (noradrenérgicas e histaminérgicas) y por fibras inhibitorias (serotoninérgicas y dopaminérgicas).

#### Mecanismos de Inactivación del TRH.

Los mecanismos de inactivación propuestos para terminar la acción de los neuropéptidos una vez que han sido liberados de las terminales nerviosas y que han ejercido su acción en la neurona postsináptica, son la degradación enzimática y/o la recaptura del péptido. En el caso del TRH la mayor parte de las evidencias apuntan hacia la degradación

Tabla 2.- Efecto de Neurotransmisores sobre la Liberación de TRH in vitro de preparaciones hipotalámicas.

Autor	Preparación	Estimulación	Inhibición	Sin Efecto
Hirooka y Hollander (1978)	Fragmentos	NA	SRIF	
Hirooka y Hollander (1980)	Cultivo	NA		
Charli et al. (1978)	Rebanadas	H		
Joseph-Bravo et al. (1979)	Fragmentos	K <sup>+</sup> H <sub>2</sub> agonistas	DA	NA, 5-HT, GABA, Ach
Kaeda y Frohman (1980)	Fragmentos	K <sup>+</sup> Veratridina DA AMPC		Neurotensina, 5-HT, NA, Ach, Substancia P, SRIF
Chen y Ramirez (1981)	Fragmentos superfundidos	5-HT		
Tapia-Arancibia y Astier (1983)	Fragmentos superfundidos		opíáceos	
Tapia-Arancibia et al. (1984)	Fragmentos superfundidos		SRIF	

Los efectos de opíáceos y SRIF se estudiaron sobre la liberación de TRH inducida por K<sup>+</sup> (Tapia-Arancibia y Astier, 1983; Tapia-Arancibia et al., 1984). DA = dopamina, NA = noradrenalina, 5-HT = serotonina, Ach = acetilcolina, GABA = ácido γ-aminobutírico, SRIF = somatostatina, H = histamina. (Tomado parcialmente de Robbins y Reichlin, 1982).

enzimática como mecanismo de inactivación (Fig. 3).

#### 1.- Degradación Enzimática.

El modo de degradación del TRH ha sido estudiado exhaustivamente y se ha demostrado que existen varias peptidasas presentes en suero y en cerebro que son capaces de degradar este péptido (Bauer, 1983). En suero, Bauer (1983) ha reportado la presencia de una peptidasa específica que degrada TRH hasta pGlu e His-Pro-NH<sub>2</sub>, que fue llamada "Tiroliberinas". Recientemente, Wilk y Friedman (1985) han mostrado que esta enzima es esencialmente la que degrada al TRH en suero.

Estudios de distribución subcelular de las peptidasas presentes en el cerebro han mostrado que existen tanto enzimas solubles como membranales. En el cerebro se han descrito dos peptidasas solubles (Browne y O'Cuinn, 1983; Torres et al., 1986): la piroglutamato aminopeptidasa (PGAs), que degrada TRH hasta His-Pro-NH<sub>2</sub>, y la "Post-Proline Cleaving Enzyme" (PPCE), que degrada TRH para formar pGlu-His-Pro-OH (TRH ácido). A su vez, el TRH ácido puede ser degradado por la PGAs para formar His-Pro (Fig. 4). A pesar de que estas dos enzimas degradan al TRH in vitro, no hay evidencias de que tengan un papel importante en la degradación del péptido in vivo. Por otra parte, en membranas de cerebro existe una PGa dependiente de metales (PGAm) (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Garat et al., 1985) que difiere en sus características y requerimientos de la PGAs. La PGAm está localizada en la membrana plasmática de sinaptosomas (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Torres et al., 1986), probablemente en su cara externa (Charli et al., manuscrito en preparación), lo que sugiere que esta enzima pudiera estar involucrada en la regulación de los niveles

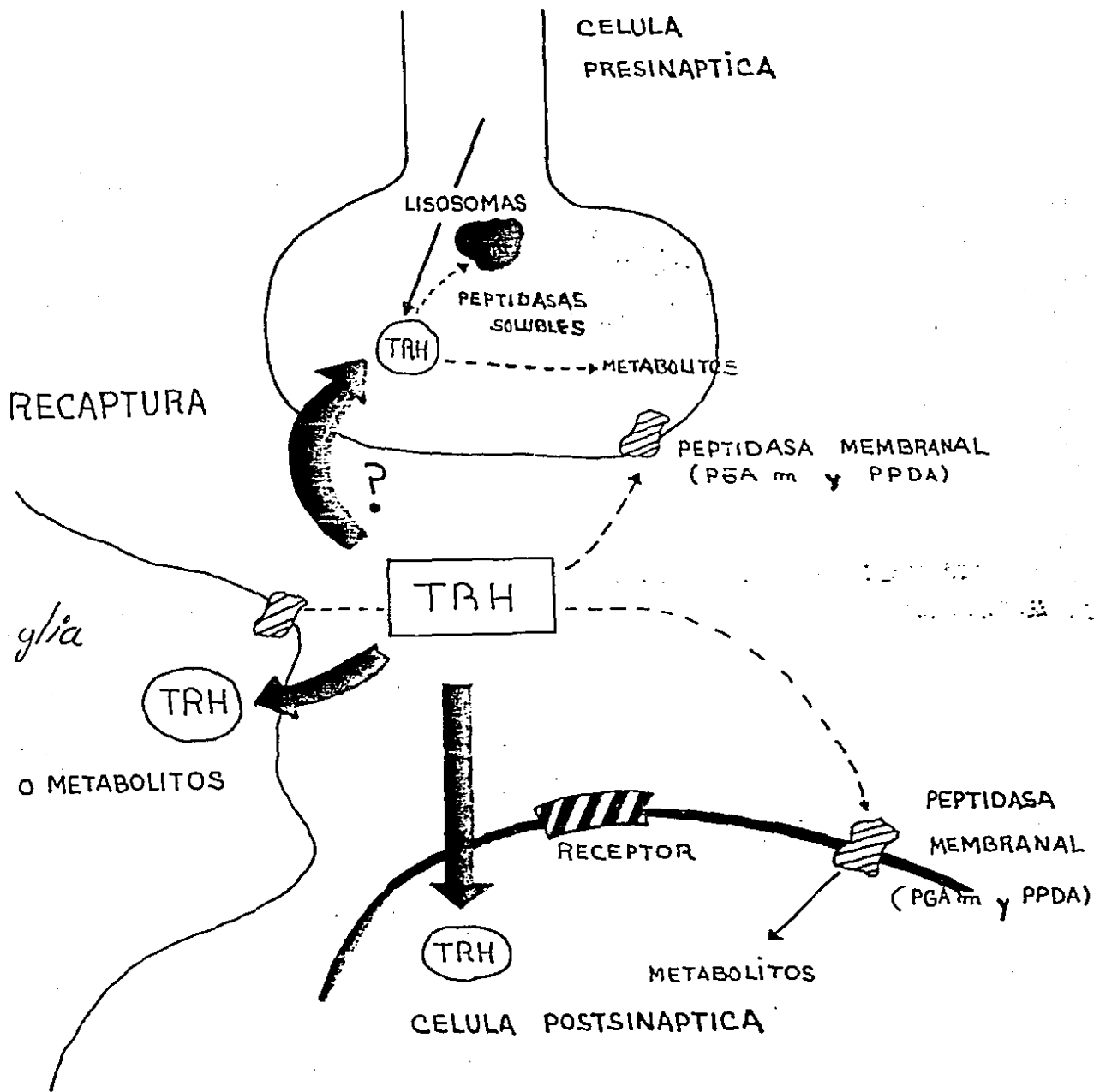
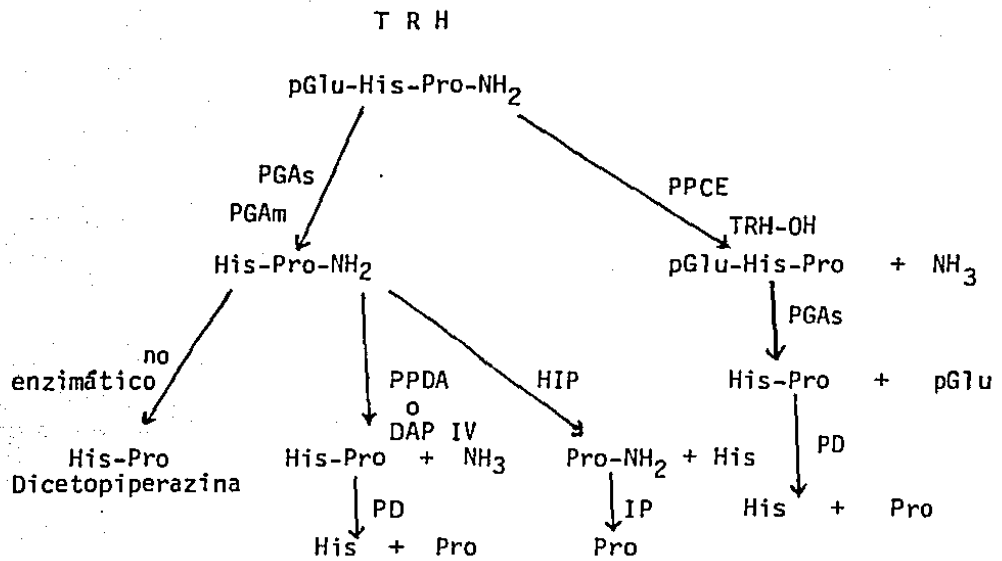


Fig. 3.- POSIBLES MECANISMOS DE INACTIVACION DE TRH EN EL ESPACIO SINAPTICO



PGAs = Piroglutamato aminopeptidasa soluble.

PGAm = Piroglutamato aminopeptidasa membranal.

PPCE = "Post-Proline Cleaving Enzyme".

PPDA = Post-prolina dipeptidil aminopeptidasa.

DAP = Diaminopeptidasa IV.

HIP = Histidil imidopeptidasa.

PD = Prolina dipeptidasa.

IP = Imidopeptidasa.

Fig. 4.- Degradación Enzimática del TRH en el Cerebro de Rata.



extracelulares del TRH, inactivando al péptido liberado al espacio sináptico. Además, esta enzima parece ser específica para degradar TRH y no otros péptidos (Wilk et al., 1986). La PGAm tiene características y requerimientos similares a los de la "Tiroliberinasa" descrita en suero (Bauer, 1983; Wilk y Friedman, 1985).

Además de la PGAm, en membranas sinaptosomales de cerebro total, hipotálamo y adenohipófisis se ha detectado la actividad de otra enzima, la post-prolin dipeptidil aminopeptidasa (PPDA), que utiliza His-Pro-NH<sub>2</sub> como sustrato para generar His-Pro (Garat et al., 1985; Wilk y Friedman, 1985) (Fig. 4). Aun más, parece existir otra enzima membranar, una histidil imido peptidasa (HIP) (Matsui et al., 1979), que forma Pro-NH<sub>2</sub> a partir de His-Pro-NH<sub>2</sub> (Torres et al., 1986) (Fig. 4).

Algunas de las enzimas que degradan TRH son susceptibles de ser reguladas. La PPCE es inhibida in vitro por TSH y la PGAs por hidrocortisona (Prasad y Peterkofsky, 1976). La HIF es inhibida por adenohipofisotropina, cadena  $\beta$  de TSH, insulina, gonadotropina coriónica humana y hormona luteinizante in vitro (Matsui et al., 1979). Por otra parte, la "Tiroliberinasa" presente en suero parece ser sensible a hormonas tiroideas (Bauer, 1976).

## 2.- Recaptura.

En cuanto al otro tipo de mecanismo de inactivación, se ha sugerido la existencia del fenómeno de recaptura de péptidos biológicamente activos, por la evidencia presentada para el dipéptido carnosina, pero no de su análogo homocarnosina (Abrahm et al., 1954). En el caso de TRH, Parker et al. (1977) encontraron que sinaptosomas

de cerebro no son capaces de captar  $^3\text{H}$ -TRH. Sin embargo, en rebanadas de cerebelo se ha demostrado la existencia de un fenómeno de captación, y los resultados obtenidos en presencia de inhibidores metabólicos y del transporte de sodio indican que se trata de un sistema de transporte activo (Pacheco et al., 1981b). En rebanadas de hipotálamo se ha descrito un fenómeno de captura con una  $K_m$  de  $1\ \mu\text{M}$  y con características semejantes a las descritas en cerebelo (Charli et al., 1984). Sin embargo, en este caso la  $V_{max}$  del fenómeno es muy baja como para asumir que éste pudiera ser el mecanismo fisiológico de inactivación del TRH que termina la acción del péptido. Así pues, la opinión general es que la recaptura no parece ser el principal mecanismo de inactivación de neuropéptidos sintetizados por vía ribosomal.

#### Receptores a TRH.

Los estudios tendientes a caracterizar los receptores a TRH se han realizado tanto en adenohipófisis como en diversas regiones cerebrales de varias especies de mamíferos, y se han utilizado  $^3\text{H}$ -TRH y  $^3\text{H}$ -He-TRH (análogo 10 veces más potente y afín que TRH) como ligandos (Labrie et al., 1972; Wilber y Seibel, 1973; Taylor y Burt, 1982; Ogawa et al., 1982; Rostène et al., 1984). Los receptores se han localizado en fracciones membranales de los homogenados correspondientes (Labrie et al., 1972; Ogawa et al., 1982; Rostène et al., 1984) y todos los estudios concuerdan en la presencia de un solo tipo de sitios de unión de alta afinidad en la adenohipófisis de las especies estudiadas (Labrie et al., 1972; Wilber y Seibel, 1973), mientras que en el cerebro total o regiones aisladas se han caracterizado dos poblaciones distintas de receptores, una de alta y

otra de baja afinidad (Taylor y Burt, 1982; Ogawa et al., 1982; Rostène et al., 1984). La constante de afinidad reportada para el sitio de alta afinidad en adenohipófisis, corteza cerebral, núcleo accumbens, retina o cerebro total de rata va de 4 a 50 nM (Burt y Snyder, 1975; Taylor y Burt, 1981; Ogawa et al., 1982; Rostène et al., 1984), mientras que se reporta un sitio de baja afinidad ( $K_d = 5 \mu M$ ) en corteza cerebral y cerebelo de rata (Burt y Snyder, 1975).

La unión de TRH a su receptor es lineal con la concentración de legrado, saturable, reversible, específica y dependiente de la dosis, de la temperatura y del pH, así como de la presencia de iones (Labrie et al., 1972; Burt y Snyder, 1975; Ogawa et al., 1982).

Debido a la correlación existente entre las potencias relativas de varios análogos y metabolitos de TRH sobre la liberación de TSH y prolactina y las  $K_i$  obtenidas en los estudios de unión a receptores, los sitios en la adenohipófisis parecen corresponder al receptor fisiológico para TRH. Los sitios de alta afinidad en diferentes regiones del cerebro, muy semejantes a los adenohipofisarios, parecen representar también receptores fisiológicos al péptido (Burt y Snyder, 1975). El número de receptores a TRH es variable según la región cerebral, como se muestra en la tabla 3. Sin embargo, hay una coincidencia entre el número de receptores detectado con  $^3H$ -TRH y el análogo metilado.

La interacción del TRH con su receptor en la membrana plasmática de los tirotrópos y de los lactotópos ocasiona la liberación de TSH y de prolactina respectivamente, lo cual ocurre a través de un mecanismo de transducción del mensaje que involucra la participación de un segundo mensajero. Geras et al. (1982) han postulado al calcio como el

Tabla 3.- Distribución de Receptores a TRH en el Sistema Nervioso Central de Rata.

Región	A fmol / mg proteína	B fmol / mg proteína
Belina	60.2 ± 3.6	
Adenohipófisis	24.8 ± 4.6	
Amígdala profunda	27.1 ± 3.2	
Amígdala superficial (y corteza temporal adyacente)	19.7 ± 0.6	
Núcleo accumbens	11.3 ± 1.1	
Hipotálamo	10.1 ± 0.6	66.4 ± 8.4
Corteza cerebral		64.8 ± 3.9
Corteza parietal	9.2 ± 0.9	
Corteza cerebral frontal	7.0 ± 0.4	
Septum dorso-lateral	9.1 ± 0.6	
Tubérculo olfatorio	7.4 ± 0.5	
Bulbo olfatorio	5.1 ± 0.6	37.8 ± 2.4
Tálamo + Cerebro medio		48.5 ± 3.2
Tallo cerebral		23.0 ± 2.7
Puente (piso del IV ventrículo)	6.6 ± 1.2	
Médula oblongada	6.3 ± 0.2	
Hipocampo	6.0 ± 1.6	61.8 ± 9.1
Corteza cerebular	4.6 ± 0.9	
Estriado	4.2 ± 0.3	21.2 ± 2.2
Médula espinal	2.9 ± 0.5	ventral 16.0 ± 1.9 dorsal 8.2 ± 1.8
Neurohipófisis	0.8 ± 0.2	

A - Datos reportados por Taylor y Burt (1982), usando 1 nM [<sup>3</sup>H]-Me-TRH. Los datos corresponden sólo a 1/4 - 1/6 de los sitios totales según la Kd de 3 - 5 nM.

B - Datos reportados por Ogawa et al. (1982), usando 12 nM [<sup>3</sup>H]-TRH.

mediador de la acción de TRH en los tirotropos y lactotropos. Las evidencias sugieren que en el caso de los lactotropos la liberación de prolactina es mediada por calcio que proviene de pozas intracelulares (Geras et al., 1982; Ronning et al., 1982), mientras que la liberación de TSH por los tirotropos parece ser mediada tanto por un influjo de calcio extracelular como por calcio de pozas intracelulares (Geras et al., 1982). Aunque no se conoce el mecanismo a través del cual el calcio desencadena la respuesta, se ha propuesto que la unión de calcio a calmodulina y la activación de enzimas dependientes de ésta podrían constituir etapas claves en dicho mecanismo (Schettini et al., 1983). Al menos en los lactotropos existen algunas evidencias que apoyan esta hipótesis. Aún más, se ha observado que el TRH estimula la hidrólisis de fosfatidilinositol en los lactotropos (Baird et al., 1983), evento que parece ser el eslabón de acoplamiento entre la activación del receptor y la movilización de calcio de pozas intracelulares. De esta manera, la hidrólisis de este fosfolípido podría causar un incremento en los niveles citosólicos de calcio a través de una movilización de pozas internas, con la subsiguiente formación de complejos calcio-calmodulina, que a su vez podrían activar enzimas o procesos celulares que desencadenaran la liberación de prolactina. En otras áreas del cerebro no se conoce aún el mediador de la acción de TRH.

#### Efectos del TRH en el Sistema Nervioso Central.

El TRH tiene múltiples efectos en el SNC, tanto neuroquímicos como electrofisiológicos, y es capaz de afectar determinados patrones de comportamiento. El TRH estimula el recambio de catecolaminas (Kerwin y Pycocck, 1979; Horst et al, 1979; Heal et al., 1983), la

Liberación de dopamina de hipotálamo y núcleo accumbens de rata (Kerwin y Pycocock, 1979; Sharp et al., 1982; Miyamoto et al., 1984) y la liberación de noradrenalina de hipotálamo (Sharp et al., 1982). Además, el TRH potencia la liberación de glutamato, aspartato, GABA y glicina inducida por estímulos depolarizantes en sinaptosomas de tallo cerebral y en sinaptosomas y rebanadas de corteza cerebral (Biggins et al., 1983).

Estudios de microiontoforesis, han mostrado que el TRH potencia las acciones excitatorias de acetilcolina en algunas poblaciones de neuronas corticales (Tarbrough, 1976; Brattman et al., 1980) y deprime la excitación inducida por ácido glutámico en algunas neuronas corticales (Renaud et al., 1979; Brattman et al., 1980). El TRH y algunos análogos tienen acción excitatorias sobre motoneuronas espinales de anfibios (Nicoll, 1977; Tarbrough y Singh, 1979), pero no afectan ni el potencial de reposo ni el evocado en el asta dorsal de la médula espinal (Tarbrough y Singh, 1979). En la rata, el TRH y algunos análogos producen un aumento marcado en el reflejo monosináptico y en la depolarización del asta ventral de la médula espinal, pero no afectan el potencial de reposo del asta dorsal. Este efecto no parece ser mediado por liberación de catecolaminas, acetilcolina o serotonina (Ono y Fukuda, 1982). Por otra parte, Schmid-Acherl et al., (1984) han sugerido que el TRH actúa como un factor trófico en neuronas motoras, ya que el péptido aumenta la actividad de la colinacetiltransferasa y la creatina cinasa en cultivos de asta ventral de médula espinal de rata, haciendo que las neuronas sean más numerosas, con procesos más largos y desarrollados.

Cuando se administra in vivo, el TRH tiene un amplio espectro de

efectos sobre el comportamiento. El TRH aumenta la actividad locomotora espontánea (Sharp et al., 1982; Heal et al., 1983; Bennett et al., 1983; Miyamoto et al., 1984); reduce el tiempo de sueño (Kalivas y Horita, 1983; Sharp et al., 1984) y la hipotermia (Sharp et al., 1984) inducidos por pentobarbital; antagoniza los efectos de etanol y algunos depresivos (Prange et al., 1979); aumenta la tasa respiratoria (Sharp et al., 1984); potencia las respuestas de comportamiento a serotonina (Green y Grahame-Smith, 1974); potencia los efectos de inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO) cuando se le administra junto con L-DOPA o metanfetamina (Spirtes et al., 1976); antagoniza muchos de los efectos de neurotensina (Osbaahr et al., 1981) y algunos de los de opiáceos (Holaday, 1984). También se ha observado que el TRH tiene efectos termoreguladores en la rata consciente (Tahida y Kastin, 1980) y parece tener un efecto protector contra el shock producido por trauma en la médula espinal (Holaday, 1984). Además, algunos autores han sugerido que el TRH actúa como antidepressivo (Prange et al., 1979).

El hipotálamo parece ser una de las áreas involucradas en el control de la actividad locomotora espontánea (Sharp et al., 1982; Bennett et al., 1983; Miyamoto et al., 1984), actividad que pudiera ser mediada a través de la liberación de dopamina inducida por TRH (Sharp et al., 1982; Bennett et al., 1983). Además, algunos núcleos hipotalámicos son relativamente sensibles a TRH en lo que se refiere a la reversión de la narcosis inducida por pentobarbital (Kalivas y Horita, 1983), acción que parece ser mediada a través de vías catecolaminérgicas, ya que antagonistas de estas aminas previenen la reversión de la narcosis por TRH.

La inyección intracerebral de un análogo de TRH (DN-1417) en la amígdala y en la formación reticular mesencefálica tiene un efecto poco potente sobre la actividad motora espontánea en la primera región, mientras que en la segunda la acción del análogo es estimuladora y comparable a la producida en otras áreas, como el hipotálamo lateral y el núcleo accumbens (Hiyamoto et al., 1984). Estos resultados sugieren que el TRH mesencefálico probablemente está involucrado en respuestas de comportamiento del tipo de la actividad motora relacionada al sistema dopaminérgico mesolímbico. Por otra parte, Pinnock et al. (1983) han mostrado que la inyección intravenosa de TRH y el análogo (3-Me-His)-TRH en la zona compacta de la sustancia nigra (que contiene los cuerpos neuronales del tracto nigroestriatal ascendente) causa un aumento transitorio en la tasa de disparo de estas neuronas.

La inyección intracerebral de TRH y análogos en el núcleo accumbens estimula la actividad locomotora espontánea y produce excitación de algunos patrones de comportamiento, efectos que son similares a los producidos por dopamina (Heal et al., 1983), por lo que esta respuesta parece estar asociada al sistema dopaminérgico mesolímbico. En este sentido, diversos autores, utilizando sistemas distintos han demostrado que la acción de TRH sobre la actividad motora es a través de la estimulación de la liberación de dopamina en esta región (Kerwin y Pycock, 1979; Sharp et al., 1982; Bennett et al., 1983). En el núcleo accumbens la actividad colinérgica nicotínica aumenta la liberación de dopamina y acelera la tasa de recambio de dopamina, lo que sugiere que el TRH y análogos podrían inducir una estimulación de la actividad motora espontánea vía activación de mecanismos nicotínicos (Hiyamoto et al., 1979). Además, el TRH y



análogos inyectados en esta región aumentan la duración de la hiperactividad producida por anfetaminas (Pinnock et al., 1983).

El núcleo accumbens parece ser un área relativamente sensible a TRH en lo que se refiere a la reversión de la narcosis inducida por pentobarbital (Kalivas y Horita, 1983; Sharp et al., 1984), y el efecto de TRH es bloqueado por antagonistas y depletores de catecolaminas (Kalivas y Horita, 1983). Sin embargo, esta acción del TRH no parece ser mediada a través de una estimulación de la liberación de dopamina, ya que ni dopamina ni d-anfetamina revierten la anestesia inducida por pentobarbital (Kalivas y Horita, 1983; Sharp et al., 1984). Aún más, el TRH inyectado en esta región revierte la hipotermia inducida por pentobarbital y aumenta la tasa respiratoria (Sharp et al., 1984). Este péptido tiene efectos muy marcados sobre sistemas termoreguladores centrales (Yehuda y Kastin, 1980), y el núcleo accumbens y el septum tienen conexiones neuronales con el área preóptica, región involucrada directamente en la termoregulación. Por otra parte, es probable que los efectos del TRH y análogos sobre la respiración sean debidos a una estimulación central, probablemente a través de la activación de las áreas reguladoras del tallo cerebral (Sharp et al., 1984).

Todos estos estudios en conjunto han llevado a postular al TRH como posible modulador de sistemas colinérgicos y aminérgicos en el SNC, y se ha sugerido que este péptido pudiera desempeñar una función fisiológica importante en los sistemas motores.

## OBJETIVOS Y METAS.

Para definir una sustancia como neurotransmisor se han sugerido los siguientes criterios: 1) capacidad de la célula nerviosa de sintetizar la sustancia; 2) localización dentro de terminales nerviosas presinápticas; 3) liberación en respuesta a estimulación; 4) unión a receptores específicos postsinápticos; 5) inducción de efectos biológicos idénticos a los producidos por estimulación nerviosa directa; 6) terminación de la acción de la sustancia por mecanismos de inactivación. Sin embargo, estos criterios se han cumplido estrictamente sólo para la acetilcolina. En el caso del TRH se satisfacen sólo algunos de estos criterios, por lo que es posible que en algunas áreas del SNC funcione como un neurotransmisor clásico, mientras que en otras module los efectos de algunos neurotransmisores.

Muchos de los efectos que produce el TRH han sido observados por la administración exógena del péptido en algunas áreas del SNC. Sin embargo, como se mencionó, se desconocen tanto los mecanismos de liberación de TRH endógeno en áreas extrahipotalámicas del cerebro de mamíferos como la disponibilidad del péptido para ser liberado en respuesta a una estimulación.

El objetivo del presente trabajo es establecer si las regiones cerebrales que contienen el péptido son capaces de liberarlo en respuesta a una depolarización (estimulación por altas dosis de KCl). En este sentido, se desea establecer si existe una correlación entre los niveles endógenos de TRH en áreas del cerebro de rata y su habilidad para liberar el péptido. Asimismo, se intenta determinar si existe correlación entre las áreas cerebrales en las que se han descrito efectos específicos, presencia de un gran número de

receptores y una alta densidad de terminales TRH-érgicas, y las áreas en las que el péptido se libera significativamente. De esta manera, el estudio de la liberación regional de TRH contribuiría al entendimiento de las funciones de este péptido en el SNC en relación a su probable función como neurotransmisor o como neuromodulador de la transmisión sináptica mediada por otras sustancias neuroactivas.

#### ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Con el objeto de determinar si el TRH presente en varias regiones del SNC es susceptible de ser liberado en respuesta a una estimulación, rebanadas o regiones enteras del cerebro de rata se incubaron in vitro en un medio fisiológico (Krebs-Ringer-Bicarbonato : KRB) y se estimularon con dosis depolarizantes de KCl. El TRH liberado al medio de incubación, tanto en condición basal como estimulada, se midió por radioinmunoensayo (RIA). Los valores de TRH liberado se compararon con los niveles de péptido detectados en los tejidos después de haberse lavado e incubado. Por otra parte, con el objeto de establecer la identidad de la(s) molécula(s) liberada(s) de rebanadas de hipotálamo con TRH auténtico, los medios de incubación (basal y estimulado) se sometieron a cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplada a RIA. Usando esta metodología se analizó también la inmunoreactividad presente en extractos hipotalámicos.

## MATERIALES Y METODOS.

### Materiales.-

En todos los experimentos se usaron ratas machos Wistar (200- 300 gr) alimentadas ad libitum (Purina Chow) y mantenidas en períodos de luz-oscuridad de 12 hrs. Los experimentos siempre se llevaron a cabo a la misma hora del día (entre las 10.00 y las 12.00 hrs. a.m.). Las ratas se sacrificaron por decapitación.

[L-2,3,4,5-<sup>3</sup>H] -prolina-TRH ( <sup>3</sup>H-pro -TRH) (102 Ci/mmol) y Na <sup>125</sup>I (17.4 Ci/mg) se obtuvieron de New England Nuclear. Gln, pGlu-NH<sub>2</sub>, pGlu-His-Gly y pGlu-His-Gly-NH<sub>2</sub> se obtuvieron de Sigma y el resto de los péptidos utilizados de Peninsula. La cadena A de insulina bovina se obtuvo de Serva. Se listan a continuación los materiales cromatográficos empleados y la fuente de obtención :

- Cartuchos Sep-Pak C<sub>18</sub> (Part No. 51910), fase reversa - Waters Associates, Inc.
- Placas de cromatografía en capa fina de alta resolución (HP-TLC) sílica gel 60, 10 X 10 cm (5 μ tamaño de partícula, 40 Å diámetro de poro) - Whatman HPLC.
- Placas de cromatografía en capa fina, sílica gel 60, 0.25 mm, 20 X 20 cm - Merck.
- Resinas Sephadex - Sigma :
  - 1) G-10-120, límite de exclusión moléculas con peso molecular promedio por arriba de 700.
  - 2) G-25-40, límite de exclusión moléculas con peso molecular promedio por arriba de 5000.
- Columna K9 para filtración en gel (57.5 cm largo X 0.9 cm diámetro

Interno) - Pharmacia.

- Columna de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Ultrasphere ODS, C<sub>18</sub>, 15 cm de largo X 4.6 mm de diámetro interno - Altex.
- Solventes grado HPLC - Baker.

El resto de los reactivos se obtuvieron de Sigma o Baker.

#### Repurificación de <sup>3</sup>H-pro -TRH.-

Ya que el TRH se degrada y con el objeto de evitar interferencias causadas por la presencia de productos de degradación y de radiólisis, el [<sup>3</sup>H-pro]-TRH debe repurificarse antes de usar. Generalmente repurificamos 25 µCi a > 95 % de pureza radioquímica, con un rendimiento de 66.6 % (repurificaciones realizadas por H. Cisneros). La repurificación se realiza por cromatografía en capa fina de alta resolución (HP-TLC) usando placas de sílica gel de 10 X 10 cm (HPKF) y desarrollando en un sistema de CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH : NH<sub>4</sub>OH (125:75:25) ( 9 cm frente del solvente ), como se ha reportado previamente (Garat et al., 1985). La radioactividad en la placa se localiza por un barrido de radioactividad ("radioscanning") realizado en la Unidad de Análisis de Aminoácidos y Proteínas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. . En la Fig. 5 se muestra un barrido de [<sup>3</sup>H - TRH]. La sección correspondiente a TRH en la placa se raspa y se eluye con 90 % metanol durante 30 min a 4 °C . Para determinar la pureza radioquímica, una alícuota del eluido metanólico se aplica a placas de sílica gel 60 de 20 X 20 cm en presencia de 1 µg de TRH sintético como acarreador, y se desarrolla en el mismo sistema de solventes ( 10 cm frente del solvente ). Se raspan secciones de 1 cm, se eluyen con 90 % metanol por 30 min a 4 °C y a los eluidos se les añaden 10 ml de líquido de

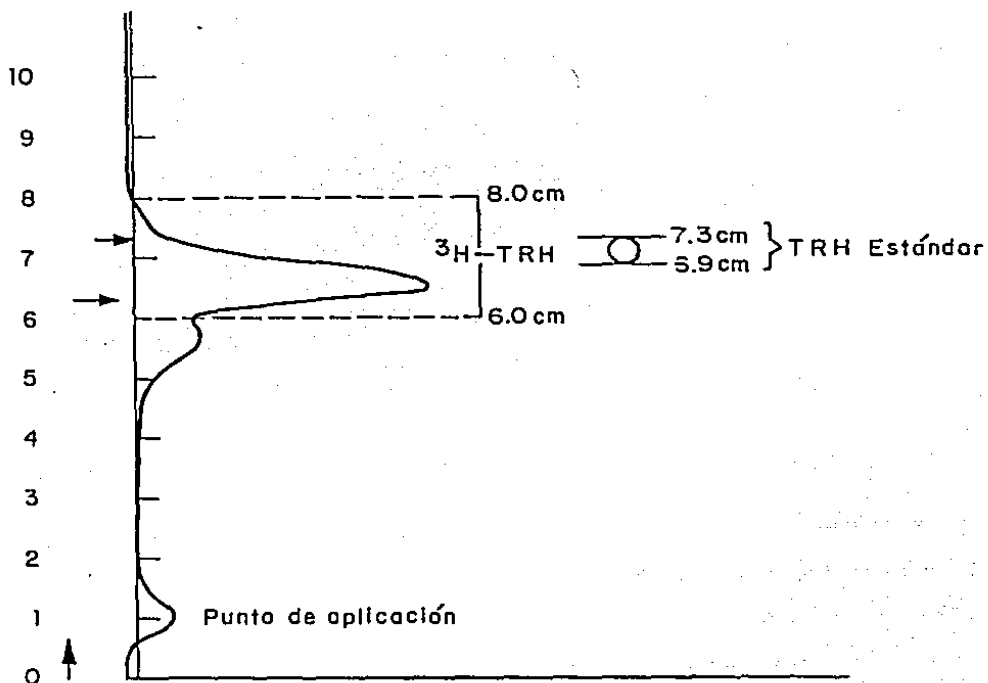


Fig. 5.- Barrido de  $^3\text{H}$ -TRH .-  $^3\text{H}$ -TRH se repurificó por cromatografía en capa fina de alta resolución (TLC-HP) usando placas de silica gel de  $10 \times 10$  cm (HPKP) y desarrollando en un sistema metanol : cloroformo : amonio (5:3:1). La radioactividad presente en la placa se determinó por barrido ("radioscanning"). En este caso se repurificaron  $22 \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -TRH.  
Escala : 200,000. Flujo : 2. Dec : 2 seg. Vel : 60 cm/hr.  
Ventana :  $2 \times 16$ .

Las repurificaciones de  $^3\text{H}$  - TRH fueron realizadas por M. Cisneros.

centelleo (Bray) (ver apéndice); la radioactividad presente en cada sección se determina en un contador de centelleo líquido (Beckman LS-7800). El TRH sintético, aplicado en un carril adyacente, se localiza en la placa revelando con reactivo de Pauli (ver apéndice).

#### Experimentos de Liberación.-

La disección de las áreas cerebrales se hizo de acuerdo a König y Klippel (1967) y De Groot (1969). El sistema de incubación utilizado es una modificación de un método usado previamente para estudiar liberación de <sup>3</sup>H-catecolaminas (Arbilla y Langner, 1978) y degradación de encefalinas en rebanadas de cerebro (De la Baume et al., 1983). Dependiendo de la región estudiada, el tejido se usó entero o bien se obtuvieron rebanadas de 250 µ de grosor en una sola dirección en un rebanador de tejidos McIlwain (Brinkman). El tejido se colocó en una jeringa de plástico de 3 ml (hipotálamo) o de 20 ml (el resto de las áreas, ya que el número de equivalentes de tejido a incubar (número de regiones) fue mayor a uno y variable según el área estudiada), cortada en su extremo distal (en relación al extremo del émbolo de la jeringa), al cual se le ha pegado una membrana de nylon (63 µ apertura de la malla). La jeringa con el tejido se transfirió inmediatamente a un recipiente conteniendo un medio Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) pH 7.4 (ver apéndice), mantenido a 37 ° C y previamente oxigenado con una mezcla de O<sub>2</sub> 95 %/CO<sub>2</sub> 5 %. El tejido permaneció en este medio durante aproximadamente 3 min, con el objeto de lavar las peptidasas solubles que se liberan de células dañadas como consecuencia de la extracción y el rebanado del tejido. La jeringa con los tejidos se transfirió a viales de vidrio (15 X 45 mm, Kimble) previamente siliconizados (ver apéndice) (hipotálamo) o a viales de plástico de 20 ml (Fisher Brand)



(el resto de las áreas estudiadas), conteniendo 0.5 o 1.5 ml de KRB, respectivamente. Las diferencias en el tamaño de viales y Jeringas se deben a la diferencia en masa de tejido a incubar según el área estudiada. Las Jeringas con los tejidos se incubaron por 10 min a 37 °C, con agitación ligera (60 osc/min), bajo atmósfera de  $O_2$  95 %/ $CO_2$  5 % en una incubadora Dubnoff. Después de este primer período de incubación, la Jeringa fue transferida a un segundo vial e incubado por otros 10 min (Fig.6). Esta operación fue repetida una vez más, de manera que consideramos como liberación basal a cantidad de TRH endógeno liberada al medio en este tercer período de incubación. Después de este período de 30 min de incubación, la Jeringa fue transferida a un cuarto vial (Fig. 6) conteniendo KRB con 56 mM KCl (la osmolaridad se mantuvo igual que antes bajando la concentración de NaCl, ya que en estas condiciones el efecto del depolarizante es mayor, como lo han reportado Joseph-Bravo et al. (1979) ) e incubada por 10 min. El TRH liberado al medio en estas condiciones constituye lo que llamamos liberación estimulada de TRH.

El efecto de 56 mM KCl sobre la liberación de TRH se evaluó como la cantidad de TRH liberado en presencia de 56 mM KCl / la cantidad de TRH liberado en condiciones basales. En los experimentos de liberación regional sólo se midió la cantidad de TRH liberada durante los periodos 3 y 4 de incubación, es decir, sólo en las condiciones consideradas como basal y estimulada por 56 mM KCl.

Inmediatamente después de cada transferencia de la Jeringa, se añadió metanol absoluto frío (66 % final) o ácido acético frío (20 % final) a los medios de incubación, con el objeto de inactivar las peptidasas que pudieran degradar el TRH liberado. Los medios se

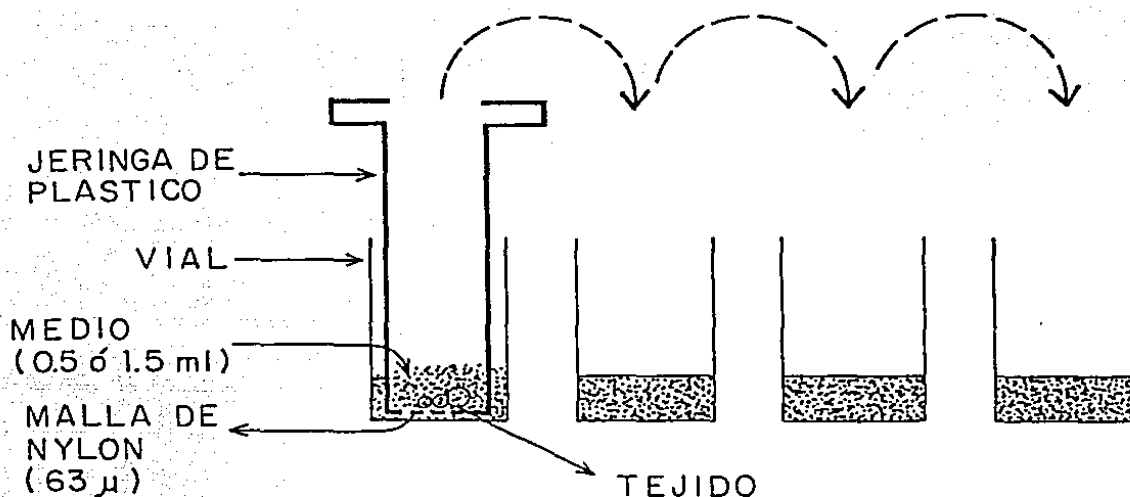


Fig. 6.- Esquema del sistema de incubación diseñado para estudiar la liberación de TRH endógeno de regiones de cerebro de rata.- Regiones enteras o rebanadas de 250 μ de grosor se colocaron en una jeringa de plástico cortada en su extremo distal, al que se ha pegado una malla de nylon. La jeringa con los tejidos se incubó a 37°C en KRB bajo atmósfera de O<sub>2</sub> 95 % / CO<sub>2</sub> 5 % por períodos sucesivos de 10 min cada uno mediante la transferencia de la jeringa. Consideramos la liberación basal como la cantidad de TRH liberada durante el tercer período de incubación, y la liberación estimulada como la cantidad de TRH liberada durante el cuarto período de incubación en presencia de 56 mM KCl.

mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta hacer los ensayos correspondientes.

Las Jeringas conteniendo los tejidos incubados se congelaron en hielo seco y posteriormente se sonicaron en 20 % ácido acético (Soniprep 150 MSE). Se separaron alícuotas para radioinmunoensayo (RIA) y para determinación de proteínas, y éstas se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta hacer los ensayos.

Se verificó que el TRH no se pega ni al vial de incubación ni a la malla de la jeringa de la siguiente manera: cuando se añadieron 15 000 cpm de [ $^3\text{H}$ -pro]-TRH repurificado a un vial conteniendo 0.5 ml de KRB y una jeringa, se recuperó el 95 % de la radioactividad añadida.

Ta que las concentraciones de TRH en las diferentes regiones del cerebro de rata son muy variables y casi indetectables en algunas de ellas (cerebelo y retina), y debido a la sensibilidad de nuestro RIA, tuvimos que aumentar el número de regiones a incubar por jeringa, y por lo tanto el volumen del medio y el tamaño de viales y jeringas, para obtener un flujo de KRB adecuado. Con el objeto de optimizar las condiciones experimentales de forma tal que pudiéramos medir la cantidad de TRH liberada en la mayoría de las regiones a estudiar, iniciamos el estudio de liberación regional variando la forma de tratar el tejido. Así, observamos que rebanadas de  $250\ \mu$  de grosor de hipotálamo responden significativamente a la estimulación por  $56\ \text{mM}$  KCl en presencia de  $2.5\ \text{mM}$  Ca ( $\text{K}^+$  / basal =  $2.45 \pm 0.95$ , media  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm \text{EEH}$ ),  $n = 3$ ) ( $p < 0.050$ ) (Fig. 7A), mientras que no se obtiene efecto cuando se incuba un hipotálamo entero (Fig. 7B). Además, si rebanadas de  $250\ \mu$  de hipotálamo permanecen en KRB durante aproximadamente 30-45 min antes de incubarse, el efecto del depolarizante es menor y no significativo

( $K^+$  / basal =  $1.51 \pm 0.58$ ,  $\bar{x} \pm EEM$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 7C). Por otra parte, cuando se incuban núcleos accumbens enteros tampoco se obtiene respuesta al depolarizante, mientras que la incubación de rebanadas de  $500 \mu$ ,  $250 \mu$  y  $250 \mu$  con agitación ligera (60 osc/min) producen un efecto de 56mM KCl de  $3.20 \pm 0.66$  ( $n = 5$ ,  $p < 0.010$ ),  $3.89 \pm 0.90$  ( $n = 5$ ,  $p < 0.005$ ) y  $4.37 \pm 0.98$  ( $n = 8$ ,  $p < 0.005$ ) (Fig. 8). Por lo tanto, todos los experimentos de liberación regional se hicieron lavando los tejidos en KRB por no más de 3 min, incubándolos inmediatamente y utilizando rebanadas de  $250 \mu$  de grosor incubadas con agitación ligera y en presencia de  $2.5 \text{ mM Ca}^{++}$ . Sólo se utilizaron regiones enteras cuando éstas tenían una masa inferior a la del hipotálamo, como es el caso de adenohipófisis, neurohipófisis, amígdala, glándula pineal, retina, eminencia media y área preóptica. El número de regiones a incubar por jeringa varió según la masa de cada área, siendo los equivalentes de tejido por jeringa los siguientes : 1 (hipotálamo), 2.5 (mesencéfalo, puente, médula oblongada, médula espinal cervical, hipocampo y vermis cerebelar), 3 (eminencia media y estriado), 4 (hemisferios cerebelares), 5 (área preóptica, adenohipófisis, neurohipófisis), 6 (núcleo accumbens, amígdala, lóbulo olfatorio, corteza cerebral frontal y posterior) o 10 (retina y glándula pineal).

#### Extracción de TRH.-

##### A.- Medios de incubación.

Debido a que una alta concentración de sales causa interferencias en el RIA de TRH (Joseph-Bravo et al., 1979), probamos un método de extracción de TRH de la muestra que elimina considerablemente la sal

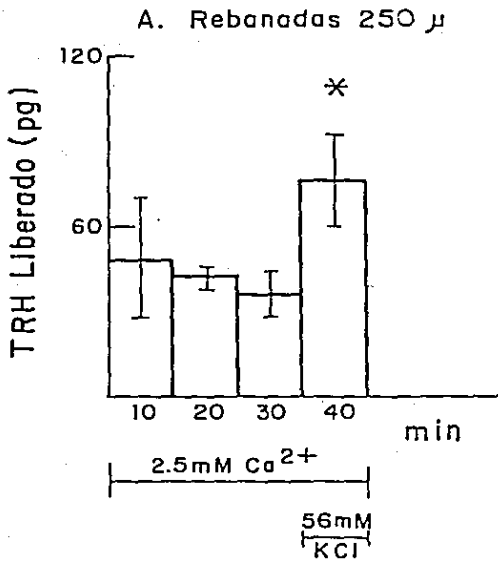
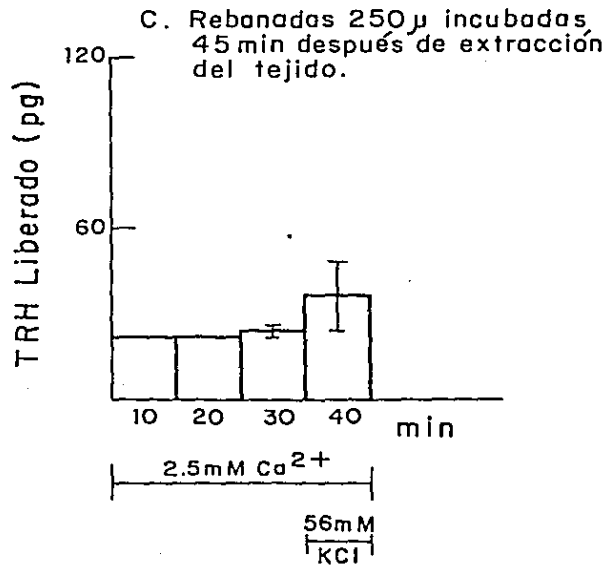
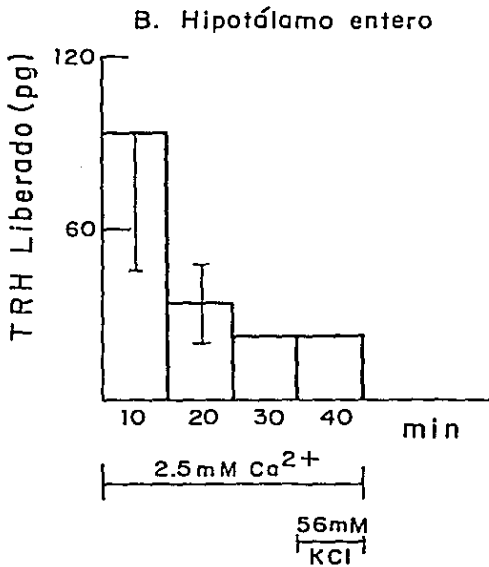


Fig. 7.- Efecto del tratamiento del tejido sobre la liberación de TRH de rebanadas de hipotálamo.- Rebanadas de 250  $\mu$  (A), hipotálamo entero (B) o rebanadas de 250  $\mu$  incubadas 45 min después de la extracción del tejido (C) se incubaron en KRB en presencia de  $Ca^{++}$  como se describe en métodos. La cantidad de TRH liberada al medio se cuantificó por RIA. El efecto del de polarizante se evaluó como la cantidad de TRH liberada en presencia de 56 mM KCl sobre la cantidad de TRH liberada en condición basal.  $2.45 \pm 0.95$  (n=3) en A;  $1.51 \pm 0.58$  (n=3) en C. \* $p < 0.050$ . Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm$  EEM).



- A. Rebanadas 500  $\mu$
- B. Rebanadas 250  $\mu$
- C. Rebanadas 250  $\mu$  con agitación  
( 60 osc./min )

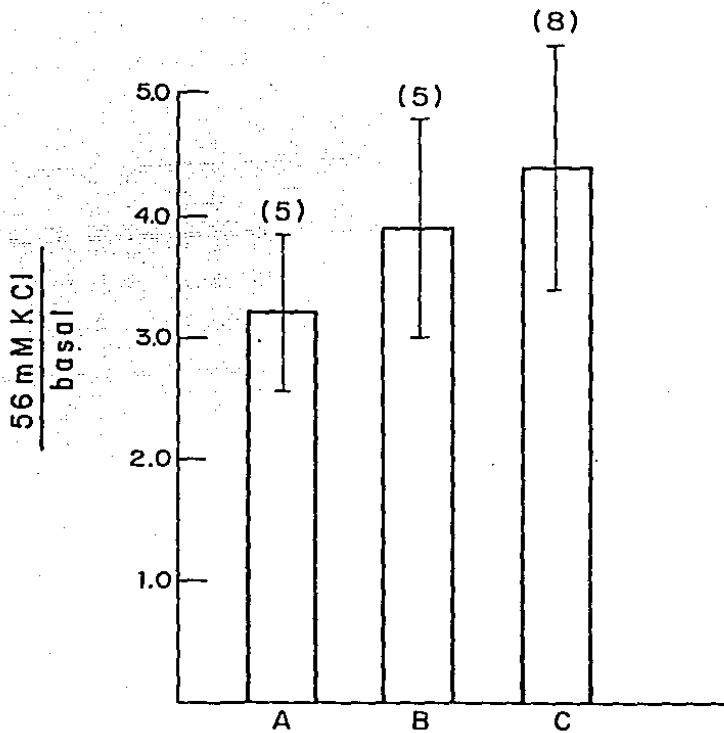


Fig. 8.- Efecto del tratamiento del tejido sobre la liberación de TRH de núcleo accumbens de rata.- Rebanadas de 500  $\mu$  (A) o de 250  $\mu$  (B y C) se incubaron en KRB sin agitación (A y B) o con agitación ligera (C) como se describe en métodos. La cantidad de TRH liberada se determinó por RIA. Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm$  EEM).  
 A :  $p < 0.01$  (n=5); B :  $p < 0.005$  (n=5); C :  $p < 0.005$  (n=8).

del medio. Los medios de incubación acidificados se neutralizaron con 7 N NaOH y se pasaron por cartuchos de Sep-Pak C<sub>18</sub>, habiéndolos activado previamente con 2 ml de metanol absoluto y 5 ml de agua bidestilada. Una vez pasada la muestra se lavó con 2 ml de agua bidestilada y el TRH se eluyó con 1.5 ml de 50 % metanol. El eluido metanólico se evaporó a sequedad en Savant (Speed Vac Concentrator/Evaporator, Savant SVC 200-H, Rotor RH 200-12) y el residuo seco se guardó a - 20 ° C para RIA. Es importante recalcar el hecho de que para obtener un buen rendimiento del proceso la muestra debe neutralizarse antes de pasarla por el cartucho, ya que, de otra manera, el péptido no se retiene en el cartucho (Tabla 4). Aunque el método es eficiente en cuanto a la eliminación de sales de la muestra, observamos que al aumentar el volúmen de la muestra disminuye el rendimiento del proceso : cuando se extrajeron 0.5 ml de KRB el rendimiento fue de  $83.12 \pm 8.99 \%$  ( $\bar{x} \pm EEH$ , n = 8), mientras que al extraer 5 ml el rendimiento fue de  $69.38 \pm 4.32 \%$  ( $\bar{x} \pm EEH$ , n = 6), medidos con [<sup>3</sup>H-pro] -TRH repurificado. Aún <sup>más este</sup> método de extracción causó interferencias en el RIA de TRH, ya que se observó desplazamiento variable de la curva estándar de TRH de ensayo a ensayo (Figs. 9A y 9B).

Por lo tanto, decidimos no usar este método de extracción previo al RIA, y probar otro sistema.

En los experimentos en que se estudió la liberación de TRH de hipotálamo, los medios de incubación a los que se había añadido metanol absoluto (66 % final, volúmen final 1.5 ml), se transfirieron a tubos ependorf, se centrifugaron 5 min a 4 ° C, 12 100 X g (Microfuga Beckman 12) y los sobrenadantes se evaporaron a sequedad en Savant.

Tabla 4.- Extracción de TRH por Sep-Pak C<sub>18</sub>. Rendimiento y Conductividad.

Condición	Conductividad Inicial	Conductividad Final	Rendimiento
KRB 20 % ac. acético	4.8 m MH0	3.4 μ MH0	16.9 %
KRB 20 % ac. acético 7 N NaOH	37 m MH0	375 μ MH0	83.1 %

500 μl de KRB conteniendo 40 000 cpm de [<sup>3</sup>H-pro]-TRH repurificado se sometieron a eliminación de sales por Sep-Pak C<sub>18</sub>. El [<sup>3</sup>H-pro]-TRH se eluyó con 1.5 ml de 50 % metanol, el eluido se evaporó a sequedad y el residuo se resuspendió en 500 μl de agua bidestilada. La conductividad de las muestras se midió en un conductímetro CDM2d (The London Company) utilizando un electrodo CDC 114. La radioactividad presente en cada etapa se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-7800. Cada condición se ensayó por duplicado.



Los residuos secos se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta hacer el RIA. Con este método de extracción no se observó efecto de las sales del KRB en el RIA de TRH, como ya se ha reportado (Joseph-Bravo et al., 1979) (Fig. 10).

En el caso del estudio de liberación de TRH de otras regiones del cerebro, el método de extracción de TRH reportado previamente (Joseph-Bravo et al., 1979), basado en la solubilidad del TRH en ácido acético y metanol, tuvo que modificarse debido a la alta concentración de sal obtenida, puesto que se tuvo que aumentar el volumen de KRB para la gran cantidad de tejido a incubar. Los medios de incubación acidificados (volumen final 1.875 ml) se transfirieron a tubos cónicos de plástico de 12 ml (Nalgene) y se centrifugaron 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , 12 100 X g (Beckman J2-21, Rotor JA-20). Los sobrenadantes se transfirieron a tubos ependorf y se evaporaron a sequedad en Savant. Los residuos se resuspendieron en 1 ml de 90 % metanol, se extrajeron por una noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  o por 30 min en baño de hielo seco/ acetona, y se centrifugaron 30 min a  $-10^{\circ}\text{C}$ , 2000 X g (Beckman TJ-6, Rotor JS-5.2). Los sobrenadantes se evaporaron a sequedad en Savant y se repitió una vez más la extracción con 90 % metanol. El residuo resultante se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para RIA. Este método de extracción resultó satisfactorio, ya que no se observaron interferencias en el RIA de TRH por altas concentraciones de sales : los medios de incubación extraídos en esta forma no desplazaron la curva estándar de TRH (Fig. 11), lo cual indica que la extracción ha eliminado una buena cantidad de la sal del KRB. La eficiencia de recuperación del método, medida con  $[^3\text{H-pro}]$ -TRH repurificado fue de  $81.02 \pm 2.12\%$  ( $\bar{x} \pm \text{EEM}$ ,  $n = 4$ ). Los datos presentados en este trabajo no están corregidos por rendimiento.

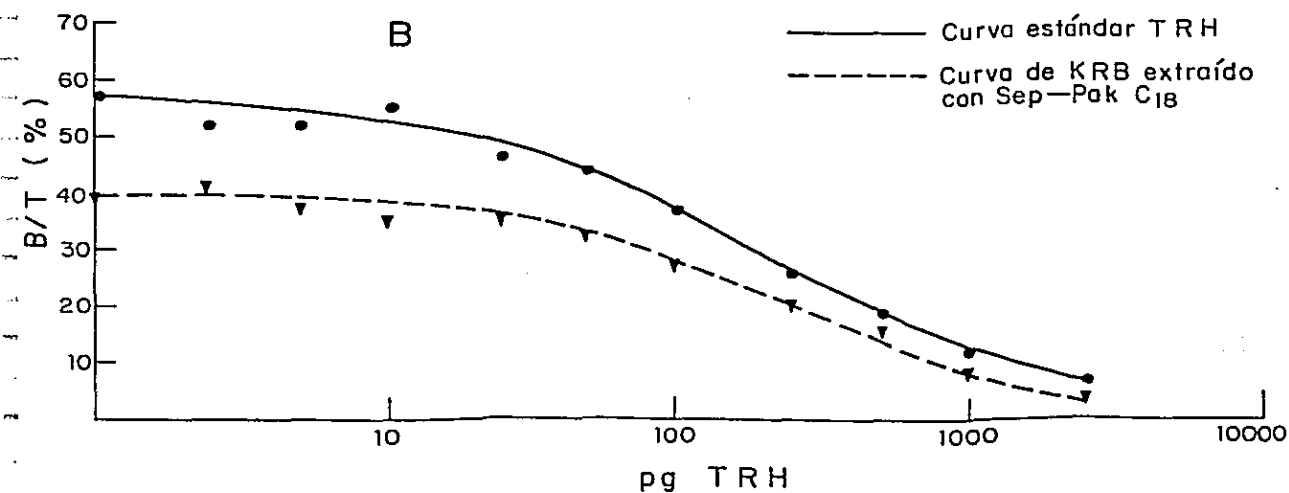
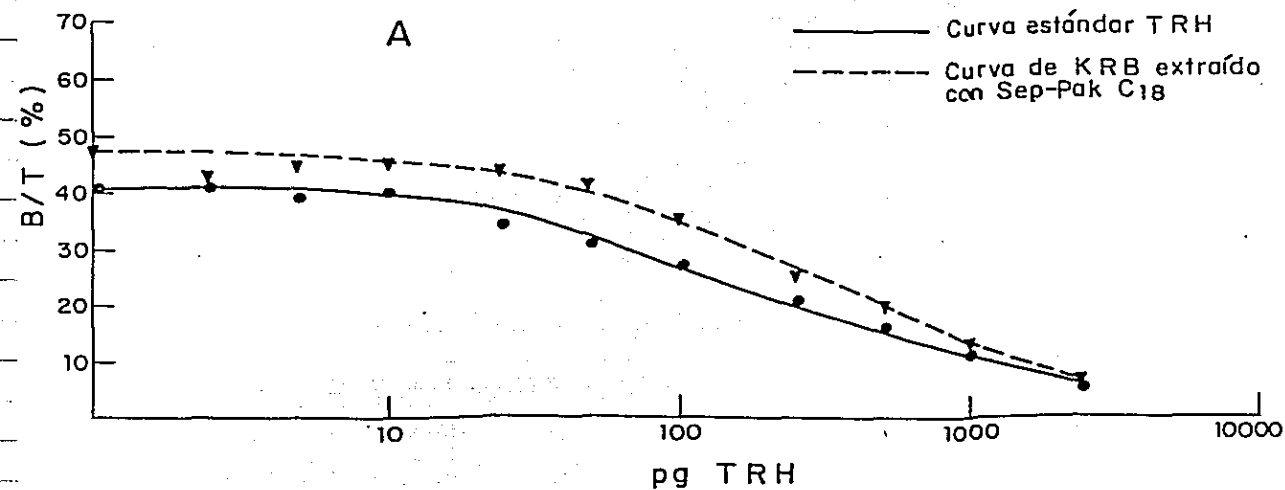


Fig. 9.- Efecto de KRB extraído por Sep-Pak C<sub>18</sub> sobre de curva estándar de TRH.- Una muestra de 1.5 ml de KRB acidificada y neutralizada se pasó por cartuchos de Sep-Pak C<sub>18</sub> con el objeto de eliminar la mayor parte de la sal del medio. Se eluyó con 50 % metanol y a los residuos se les añadieron las cantidades indicadas de TRH sintético. Se muestran dos ejemplos ensayados en ocasiones diferentes.

B = cpm de <sup>125</sup>I - TRH unidas al anticuerpo en presencia de las concentraciones de TRH indicadas.

T = cpm totales de <sup>125</sup>I - TRH en ausencia del anticuerpo.  
 Cada punto se ensayó por duplicado.

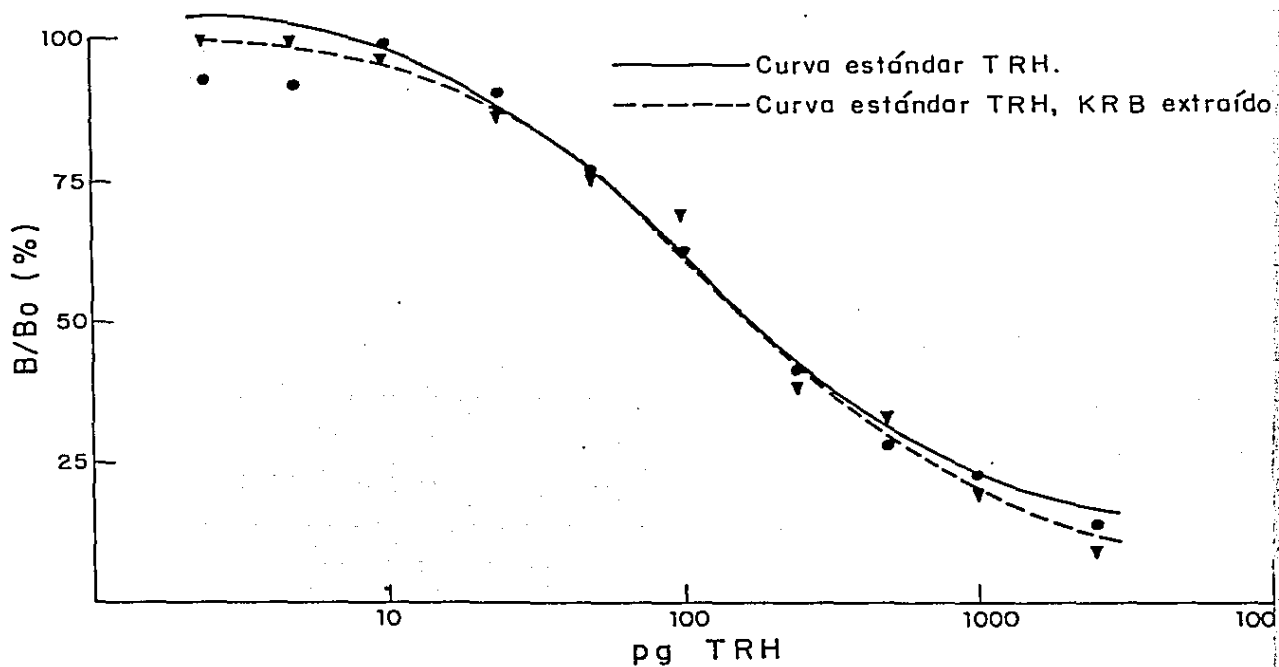


Fig. 10.- Efecto de KRB extraído con metanol sobre la curva estándar de TRH. Una muestra de 0.5 ml de KRB se extrajo con metanol (66 % final) como se describe en métodos. A los residuos secos se les añadieron las cantidades indicadas de TRH sintético.  $B_0$  = cpm de  $^{125}$  I - TRH unidas al anticuerpo en ausencia de TRH sintético.  $B$  = cpm de  $^{125}$  I - TRH unidas al anticuerpo en presencia de las concentraciones indicadas de TRH. Cada punto se ensayó por duplicado.

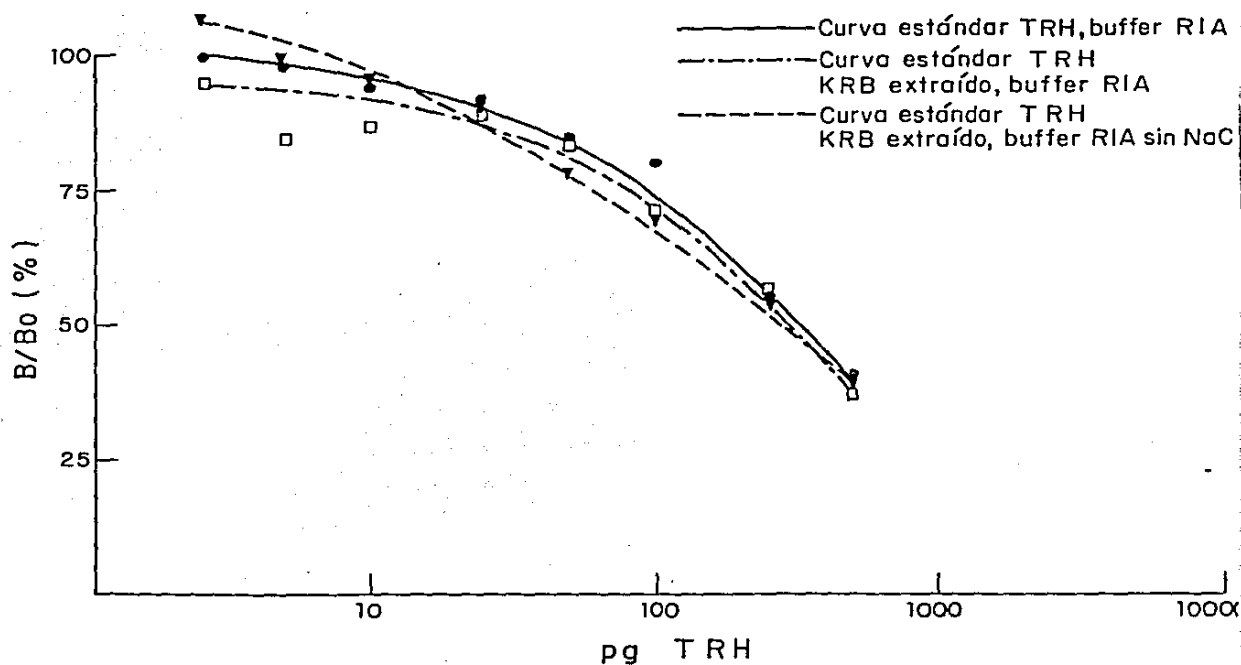


Fig. 11.- Efecto de KRB extraído con ácido acético/metanol/metanol sobre la curva estándar de TRH.- Una muestra de 1.5 ml de KRB se extrajo con ácido acético (20 % final) y con metanol (90 %) como se describe en métodos, y a los residuos se les añadieron las cantidades indicadas de TRH sintético. En una serie de muestras extraídas en esta forma se omitió el NaCl del buffer de RIA con el objeto de reducir la concentración de sal en la muestra.  
 $B_0$  = cpm de  $^{125}\text{I}$  - TRH unidas al anticuerpo en ausencia de TRH sintético.  
 $B$  = cpm de  $^{125}\text{I}$  - TRH unidas al anticuerpo en presencia de las concentraciones indicadas de TRH.  
 Cada punto se ensayó por duplicado.

## B.- Tejidos.

Los homogenados en ácido acético se centrifugaron 10 min a 4° C, 12 100 X g (Microfuga Beckman 12) y el sobrenadante se evaporó a sequedad en Savant. El residuo se extrajo con 1 ml de 90 % metanol a -20° C por una noche, se centrifugó de la misma manera y el residuo resultante de la evaporación a sequedad del sobrenadante se mantuvo a -20° C para RIA. El rendimiento del proceso fue de  $72.45 \pm 1.90$  % ( $\bar{x} \pm EEH$ , n= 4), medido con [ $^3$ H-pro] -TRH repurificado. Los datos presentados en este trabajo no están corregidos por rendimiento.

### Radioinmunoensayo de TRH.-

#### 1.- Caracterización del anticuerpo anti-TRH (R<sub>2</sub>).

El anticuerpo R<sub>2</sub> utilizado para el RIA de TRH es un anticuerpo cuya caracterización parcial ya ha sido reportada (Joseph-Bravo et al., 1979). Un estudio más exhaustivo sobre su especificidad (Tabla 5) demuestra que cruza fuertemente con péptidos que contienen una modificación o sustitución en el residuo de histidina, como es el caso de [Phe<sup>2</sup>]-TRH y [3-~~Me~~-His<sup>2</sup>]-TRH. En cambio, el anticuerpo cruza pobremente cuando el extremo NH<sub>2</sub> terminal es modificado sustancialmente. Como se observa, <sup>el</sup> anticuerpo R<sub>2</sub> no reconoce metabolitos de TRH (pGlu-His-Pro, His-Pro-dicetopiperazina, pGlu-His, pGlu).

#### 2.- Titulación del anticuerpo R<sub>2</sub>

El anticuerpo R<sub>2</sub> se tituló de la siguiente manera. El suero liofilizado se resuspendió en 1 ml de buffer fosfatos 0.01 M + 150 mM

Tabla 5.- Caracterización del anticuerpo anti-TRH R<sub>2</sub>. Valores B / Bo .

Aminoácido o Peptido	Cantidad de Sustancia ( ng )					
	0.5	5	50	500	1000	5000
Gln						97
p-Glu						89
p-Glu-NH <sub>2</sub>						91
p-Glu-His						96
p-Glu-His-Gly				94	88	83
p-Glu-His-Gly-NH <sub>2</sub>			94	81	81	63
p-Glu-His-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	69	41	9	0.4		
p-Glu-His-3,4-Dehidro-Pro-NH <sub>2</sub>	32	7	1	0.1		
[ 3-Me-His <sup>2</sup> ]-TRH	30	6	1	0.9		
[ Phe <sup>2</sup> ]- TRH	11	2	0.6	0.6		
His-Pro-Dicetopiperazina	88	79	81	58	49	27
p-Glu-His-Pro	88	96	81	83	68	45
TRH	38					

[<sup>125</sup>I]-TRH y R<sub>2</sub> (dilución final 1 / 15 000) se incubaron en presencia de cantidades crecientes de aminoácidos o péptidos como se describe en el RIA en métodos. Los datos se expresan como cpm de [<sup>125</sup>I]-TRH unido en presencia de la sustancia sobre cpm de [<sup>125</sup>I]-TRH unido en su ausencia (B / Bo). El 50 % de B / Bo se obtuvo a 2.3 ng para p-Glu-His-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, 920 ng para His-Pro-Dicetopiperazina y 3 500 ng para p-Glu-His-Pro. La unión de [<sup>125</sup>I]-TRH en ausencia de sustancia sobre las cpm totales de [<sup>125</sup>I]-TRH añadidas por tubo (Bo / T) fue del 30 %. (Datos de P. Joseph-Bravo y P. de la Torre).

NaCl filtrado en condiciones de esterilidad y se prepararon alícuotas 1/10. De este suero se hicieron diluciones seriadas con buffer de RIA (ver apéndice), de 1/500 a 1/50 000 finales. A cada dilución del anticuerpo se añadieron 10 000 cpm de  $[^{125}\text{I}]\text{-TRH}$  repurificado y se incubó a  $4^\circ\text{C}$  por 24 hr. (volumen final 200  $\mu\text{l}$ ). Se añadió 1 ml de etanol absoluto frío, se centrifugó 30 min a  $4^\circ\text{C}$ ,  $2000 \times g$  y se eliminó el sobrenadante por aspiración con vacío. El precipitado se contó en un contador gamma (Beckman DP-5500) y se determinó el porcentaje de cuentas unidas al anticuerpo para cada dilución sobre el total de cpm. El título del anticuerpo es la dilución del mismo que da el 30 % de Bo/T (Fig. 12), el cual fue de 1/25 000 para algunas alícuotas o de 1/45 000 para otras alícuotas del suero liofilizado.

### 3.- Iodación de TRH y Purificación de $^{125}\text{I}\text{-TRH}$ .

El TRH se iodó por el método de Cloramina T (Greenwood et al., 1963) según lo descrito por Joseph-Bravo et al. (1979), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en 2.5  $\mu\text{g}$  de TRH sintético en 25  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.5, con 0.25 % de albúmina sérica bovina (grado RIA), al que se le añadieron 0.5 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$ . La reacción se inició por adición de 30  $\mu\text{g}$  de cloramina T en 10  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.5, se agitó y después de 20 seg a temperatura ambiente la reacción se detuvo con 150  $\mu\text{g}$  de metabisulfito de sodio en 10  $\mu\text{l}$  del mismo buffer. Se añadieron 25  $\mu\text{l}$  del buffer de fosfatos y se volvió a agitar.

Para la purificación y repurificación de  $[^{125}\text{I}]\text{-TRH}$  se usó el método descrito por Joseph-Bravo et al. (1979). La mezcla de la reacción de iodación de TRH se aplicó a una columna de Sephadex

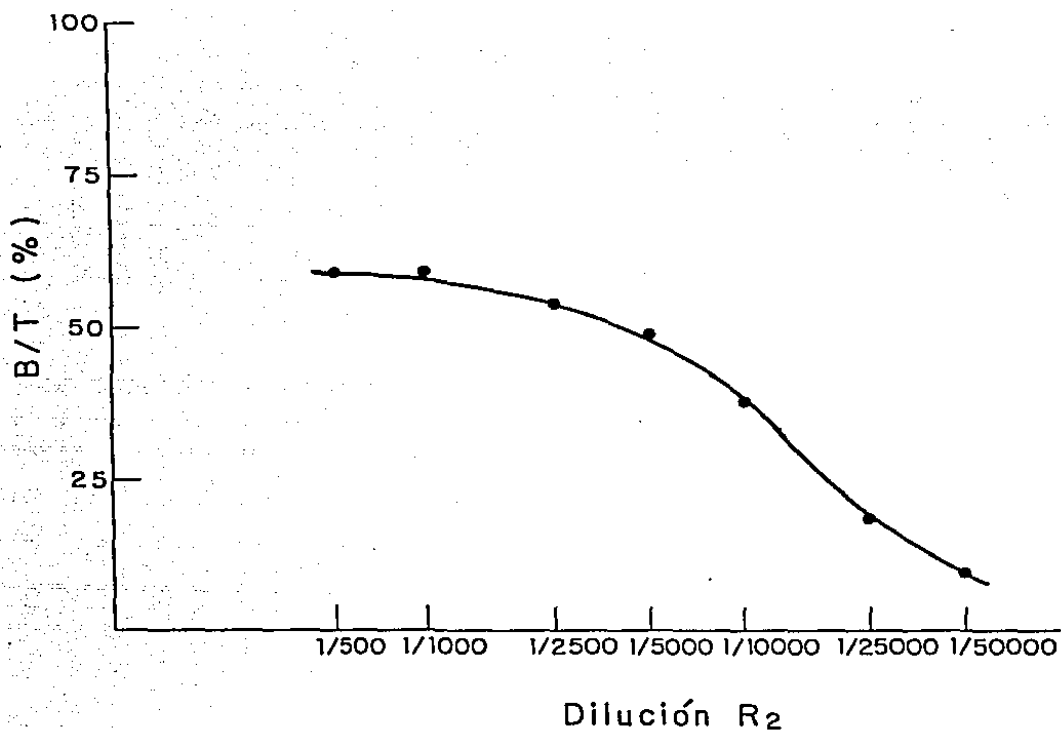


Fig. 12.- Curva de titulación del anticuerpo R<sub>2</sub> anti-TRH. - Diluciones seriadas del anticuerpo R<sub>2</sub> se incubaron en presencia de <sup>125</sup>I - TRH a 4°C durante 24 hrs y el complejo <sup>125</sup>I-TRH - R<sub>2</sub> se precipitó con etanol absoluto. Se determinó el porcentaje de cpm unidas al anticuerpo para cada dilución de éste sobre el total de cpm de <sup>125</sup>I - TRH. El título del anticuerpo (al 30 % B/T) fue de 1/25 000 en este caso. Cada punto se ensayó por triplicado.



G-10-120 de 15 cm de largo por 1 cm de diámetro (volumen interno de la columna 15 cm<sup>3</sup>), previamente equilibrada durante una noche a temperatura ambiente con buffer fosfatos 0.05 M, pH 7.5 y 0.25 % albúmina sérica bovina (ASB) (grado RIA). La elución se hizo con el mismo buffer a temperatura ambiente y a una velocidad de flujo de 3-5 gotas/min. Se colectaron de 60 a 80 fracciones de 20 gotas/tubo. Para determinar el volumen de elución de <sup>125</sup>I -TRH se tomó una alícuota de 5 µl de cada fracción de la columna y se contaron en un contador gamma (Fig. 13). Se checó la inmunoreactividad de las fracciones pertinentes utilizando el anticuerpo R<sub>2</sub> a una dilución final de 1/10 000 y tomando 10 000 cpm de <sup>125</sup>I -TRH de cada fracción a probar en un volumen final de 100 µl. Se incubó 24 hrs a 4 °C, se centrifugó 30 min a 4 °C, 2000 Xg y el sobrenadante se descartó por aspiración con vacío. Los precipitados se contaron en un contador gamma y se determinó el porcentaje de Bo/T para cada fracción. En la mayoría de los casos la inmunoreactividad del péptido marcado fue de 50 % Bo/T (rango : 42-54 % Bo/T) (Fig. 13).

Con el objeto de eliminar interferencias por posible radiólisis, las fracciones inmunoreactivas del péptido marcado se repurificaron utilizando otra columna de Sephadex G-10-120 en las mismas condiciones descritas. Esto se hizo en las 2-4 semanas posteriores a la iodación, y en todos los ensayos se usó <sup>125</sup>I -TRH repurificado.

#### 4.- RIA de TRH.

El RIA de TRH es básicamente el descrito por Joseph-Bravo et al. (1979), con algunas modificaciones. La mezcla de incubación consistió en 50 µl de R<sub>2</sub> (1/25 000 o 1/45 000 dilución final), 5 µl <sup>125</sup>I -TRH

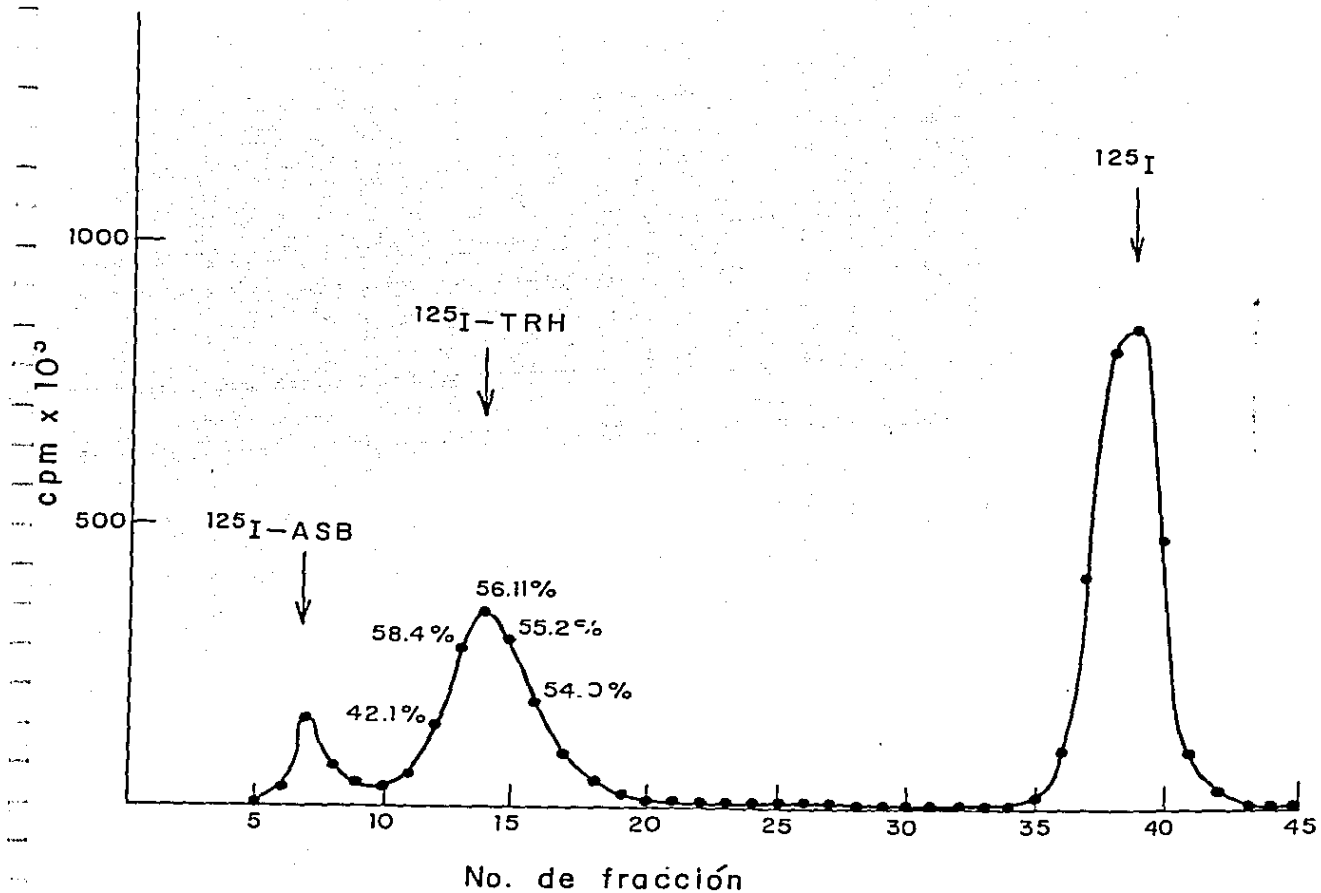


Fig. 13.- Perfil cromatográfico de  $^{125}\text{I}$  - TRH purificado por filtración en gel.- Una alícuota de TRH sintético se iodó como se indica en métodos y se purificó por filtración en gel (Sephadex G-10-120). La radioactividad presente en cada fracción se determinó en un contador gamma (Beckman DP-5500). Algunas de las fracciones se incubaron en presencia del anticuerpo  $\text{R}_2$  y se determinaron los porcentajes de  $\text{Bo/T}$  con el objeto de checar la inmunoreactividad. En la mayoría de los casos, la inmunoreactividad fue de 50 %  $\text{Bo/T}$ .

repurificado, y el residuo de los extractos de los tejidos resuspendidos en 200  $\mu$ l de buffer de RIA, o bien el residuo de los medios de incubación resuspendidos en 400  $\mu$ l de buffer de RIA sin NaCl. La mezcla se agitó y se incubó por 36-48 hrs a 4° C. El complejo TRH-anticuerpo se precipitó con 1 ml (para tejidos) o 2 ml (para medios de incubación) de etanol absoluto frío y se centrifugó 30 min a 4° C, 2000 X g. El sobrenadante se eliminó por aspiración con vacío y los precipitados se contaron en un contador gamma. La curva estándar de TRH se preparó por diluciones seriadas de TRH sintético con buffer de RIA (2.5 a 1000 pg) y la sensibilidad del ensayo (90 % B/B<sub>0</sub>) fue de 10 a 20 pg (Figs. 9-11). En todos los ensayos se introdujo un estándar interno (extractos hipotalámicos) que permitió hacer las correcciones necesarias por variaciones inter-ensayo.

Los pg de TRH en las muestras experimentales se determinaron con un programa Logit-log usando una calculadora programable TI-59 o TI-66.

#### Determinación de Proteínas.-

Con el objeto de lograr una disgregación adecuada del tejido, los homogenados acidificados se hidrolizaron por 24 hrs. a temperatura ambiente con un volumen igual de 4.5 N NaOH (el volumen de hidrólisis se ajustó a 400  $\mu$ l por cada 100  $\mu$ g de proteína con 0.5 N NaOH). La cuantificación de proteínas en el hidrolizado se hizo de acuerdo a Lowry et al. (1951).

#### Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).-



sintético con el objeto de evaluar rápidamente la eficiencia de los lavados. De esta manera verificamos que después de los 3 lavados no se detecta prácticamente nada de TRH en los eluidos (M. Cisneros, observaciones no publicadas).

La eficiencia total del proceso de análisis del TRH (desde la extracción hasta el final del HPLC), medida con [ $^3\text{H-pro}$ ]-TRH, fue de  $58.12 \pm 0.23$  % ( $\bar{x} \pm \text{EEH}$ ,  $n = 3$ ). Los rendimientos de las etapas de purificación por Sep-Pak C<sub>18</sub> y HPLC en estas condiciones fueron  $90.13 \pm 4.40$  % ( $\bar{x} \pm \text{EEH}$ ,  $n = 3$ ) y  $85.08 \pm 1.29$  % ( $\bar{x} \pm \text{EEH}$ ,  $n = 3$ ), respectivamente.

Filtración en gel : Sephadex G-25-40.-.

En otra serie de experimentos, los medios de incubación y los extractos de los tejidos se sometieron a cromatografía por filtración en gel (Sephadex G-25-40), con el objeto de determinar el peso molecular de la(s) molécula(s) inmunoreactiva(s) presentes tanto en los tejidos como en los medios. La columna (volumen interno  $51.7 \text{ cm}^3$ ) se equilibró con 20 % ácido acético por una noche a  $4^\circ \text{C}$  y se usaron los siguientes marcadores para calibrarla : azul dextrán (1 mg,  $\text{PM} = 2,000,000$ ), albúmina sérica bovina (2 mg,  $\text{PM} = 66,200$ ), cadena A insulina bovina (1.3 mg,  $\text{PM} = 2,532$ ), [ $^3\text{H-Pro}$ ]-TRH (100,000 cpm,  $\text{PM} = 361$ ), His-Leu (2 mg,  $\text{PM} = 286$ ). Todos los marcadores se resuspendieron en 1 ml de 20 % ácido acético y se aplicó toda la muestra a la columna. La calibración de ésta se llevó a cabo a un flujo de 1 ml/10 min (28 gotas/tubo) y se colectaron fracciones de 1 ml. El volumen de elución se determinó por absorbancia a 280 nm en el caso de azul dextrán, albúmina sérica bovina y cadena A insulina bovina, por conteo

de radioactividad en el caso de [ $^3\text{H}$ -pro] $^1$ -TRH, y por aplicación de las fracciones colectadas de His-Leu en papel Whatman 1 revelando con reactivo de Pauli (ver apéndice).

Los medios de incubación y los extractos de los tejidos se extrajeron con 66 % metanol como se describió para los experimentos de HPLC. Los residuos se resuspendieron en 1 ml de 20 % ácido acético y se aplicaron a la columna de Sephadex G-25-40 calibrada. El TRH se eluyó con 20 % ácido acético a 4 °C, a un flujo de 1 ml/10 min (28 gotas/tubo) y se colectaron fracciones de 1 ml. Estas se evaporaron a sequedad y los residuos se sometieron a RIA.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando la prueba de t pareada y no pareada de Student.

## RESULTADOS.

### Distribución Regional de TRH en el Cerebro de Rata.

Los niveles de TRH se cuantificaron por RIA en varias regiones del cerebro de rata (Tabla 5). La mayor concentración de TRH se presentó en la eminencia media, seguida del área preóptica, el hipotálamo total, el núcleo accumbens y la neurohipófisis, con un rango de concentración que va desde 6221 a 118 pg TRH / mg tejido húmedo. En otras áreas del cerebro encontramos concentraciones intermedias del péptido, que van desde 32 a 10 pg TRH / mg tejido húmedo, y que incluye áreas como el lóbulo olfatorio, la amígdala, la médula espinal (región cervical), el mesencéfalo, el puente, la médula oblongata, la corteza cerebral frontal (olfatoria) y el estriado. En la glándula pineal, el hipocampo, la adenohipófisis, la corteza cerebral (anterior y posterior), el cerebelo total, la vermis cerebelar y la retina, la concentración de TRH es muy baja y en algunos casos prácticamente indetectable (6.2 a 0.58 pg TRH / mg tejido húmedo).

En ninguna de las áreas estudiadas encontramos una correlación entre los niveles de TRH (contenido total / estructura o concentración) y el peso de la región en cuestión.

La distribución regional de TRH que se muestra en la tabla 6 concuerda con la reportada por otros autores (ver Tabla 1), lo cual confirma la especificidad del anticuerpo utilizado y permite usarlo en el estudio de liberación de TRH en el cerebro de rata.

Tabla 6.- Distribución Regional del TRH en el Cerebro de Rata.

Región	TRH total / estructura ( pg )	pg TRH / mg tejido húmedo	n
Hipotálamo total	5 553 ± 450	197 ± 21	12
Eminencia media	982 ± 161	6 221 ± 1 309	6
Cuerpos mamilares	364 ± 64	83 ± 13	10
Area preóptica	1 565 ± 326	376 ± 139	10
Núcleo accumbens	1 436 ± 175	143 ± 29	12
Neurohipófisis	140 ± 21	118 ± 18	15
Lóbulo olfatorio	970 ± 174	32 ± 4	12
Amígdala	200 ± 15	24 ± 3	17
Médula espinal (cervical)	817 ± 142	20 ± 3	8
Tallo cerebral total	2 263 ± 322	31 ± 2	8
Mesencéfalo	991 ± 302	16 ± 3	4
Puente	719 ± 106	10 ± 1	8
Médula oblongada	1 469 ± 289	14 ± 3	7
Estriado	375 ± 59	10 ± 2	5
Glándula pineal	8.1 ± 2.2	6.2 ± 1.8	12
Hipocampo	277 ± 41	5.0 ± 0.6	12
Adenohipófisis	28 ± 5	4.3 ± 0.8	17
Corteza cerebral anterior	632 ± 187	2.4 ± 0.64	8
Corteza cerebral posterior	995 ± 229	2.6 ± 0.67	6
Corteza cerebral frontal ( olfatoria )	379 ± 60	11.0 ± 0.82	5
Cerebelo total	165 ± 45	0.7 ± 0.18	8
Vermis cerebelar	114 ± 9	1.0 ± 0.06	5
Retina	5.7 ± 1.4	0.58 ± 0.14	12



### Liberación de TRH endógeno de Hipotálamo de Rata.

Ta que el hipotálamo es la región que presenta la mayor concentración de TRH y es el área en que el péptido ha sido más caracterizado, iniciamos el estudio de liberación de TRH en este tejido. Con el objeto de evaluar nuestro sistema de incubación, estudiamos la habilidad de este tejido de liberar TRH al medio de incubación en respuesta a una dosis depolarizante de KCl, así como la dependencia de  $Ca^{++}$  del proceso. En presencia de 0.75 mM  $Ca^{++}$ , rebanadas de hipotálamo liberan una gran cantidad de TRH al medio durante los primeros 10 min de incubación. La liberación de TRH disminuye progresivamente durante los siguientes 20-30 min, alcanzando un nivel basal estable. La basal alcanzada en este momento se mantiene estable hasta los 60 min de incubación en este sistema (Fl. 14). En contraste, la liberación basal de TRH en ausencia de  $Ca^{++}$  es muy variable durante toda la incubación (datos no mostrados). Si el tejido es estimulado con 56 mM KCl después de 30 min de estabilización del tejido en el sistema (en presencia de calcio), el efecto del depolarizante es de  $4.89 \pm 0.81$  sobre la basal ( $\bar{x} \pm FEM$ ,  $n = 3$ ) y significativo ( $p < 0.010$ ) (Fig. 15A), mientras que el efecto de la estimulación del tejido con el depolarizante después de una estabilización del mismo por 20 min es mucho menor ( $1.83 \pm 0.39$  sobre la basal,  $\bar{x} \pm FEM$ ,  $n = 3$ ) y no significativo (Fig. 15C). Cuando el calcio es omitido del medio de incubación, el depolarizante no tiene efecto, aún cuando la estimulación se realice después de 30 min de estabilización (Figs. 15 B y D). En estos casos la relación  $K^+$  / basal es de  $0.93 \pm 0.28$  (30 min estabilización) y de  $1.25 \pm 0.37$  (20 min estabilización) ( $\bar{x} \pm FEM$ ,  $n = 3$  en ambos casos). Por lo tanto, en los

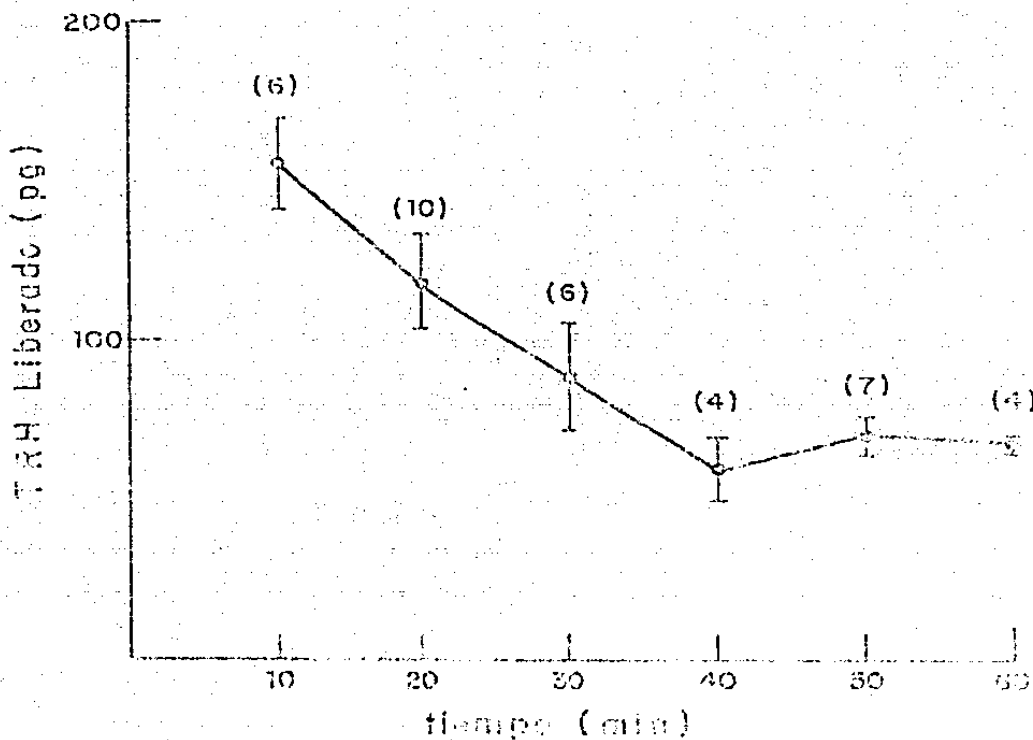
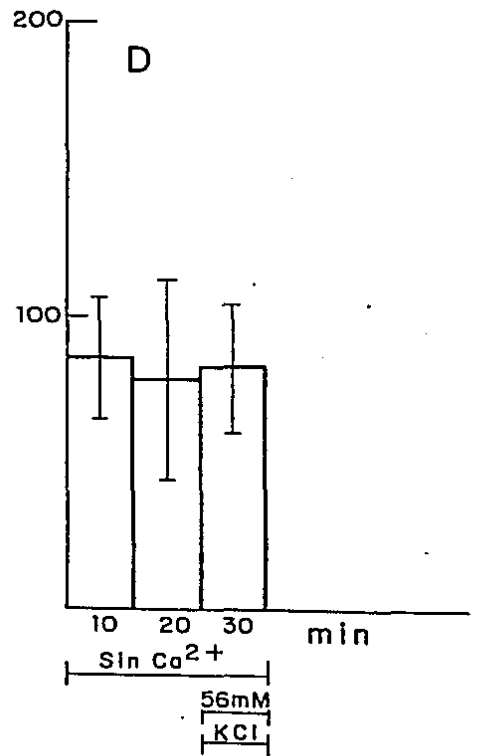
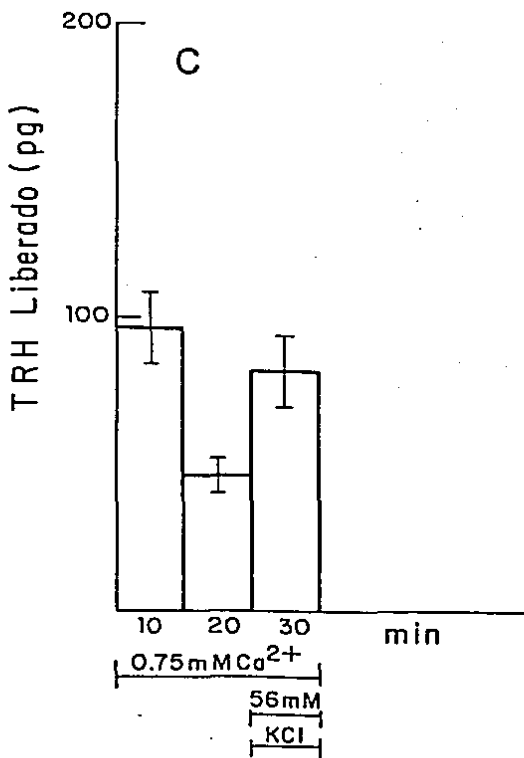
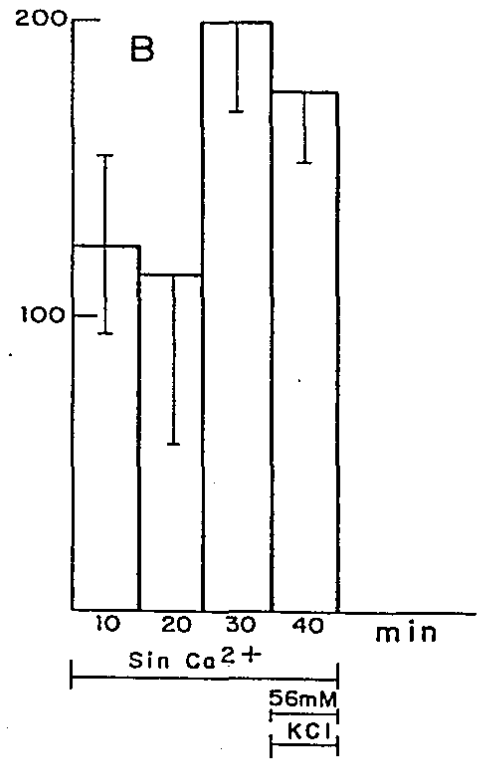
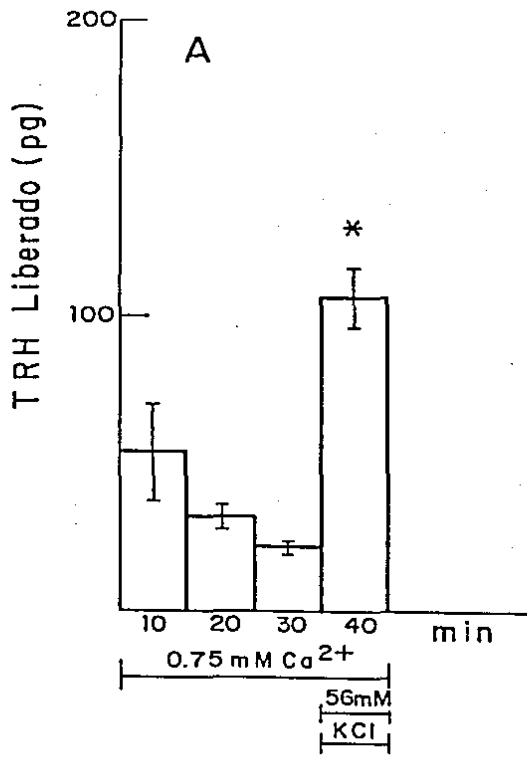


Fig. 14.- Cinética de liberación de TRH de ribanadas de histamina.- El tejido se incubó en O<sub>2</sub> en presencia de  $2.5 \mu\text{M Cu}^{2+}$  y la cantidad de TRH liberado al medio se cuantificó por RIA. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media (n = número de repeticiones). El número en paréntesis indica el número de terminaciones.

Fig. 15



siguientes experimentos la estimulación con el depolarizante se realizó después de estabilizar el tejido en el sistema por 30 min.

Por otra parte, la magnitud de la estimulación por 56 mM KCl fue equivalente en presencia de 0.75 mM o 2.5 mM  $Ca^{++}$  (Fig. 16), obteniéndose un efecto de  $3.09 \pm 0.94$  ( $\bar{x} \pm EEM$ ,  $n = 6$ ) y  $3.04 \pm 0.66$  ( $\bar{x} \pm EEM$ ,  $n = 13$ ) sobre la basal, respectivamente, sin que existan diferencias significativas entre ambas condiciones. El efecto del depolarizante en presencia de calcio a cualquiera de estas concentraciones fue significativo ( $p < 0.050$ ). Los siguientes experimentos se hicieron en presencia de 2.5 mM  $Ca^{++}$ .

Con el objeto de caracterizar aún más la dependencia de calcio, en otra serie de experimentos estudiamos los efectos de un quelante (EGTA) y de una alta concentración de  $Hg^{++}$ . El efecto estimulador de 56 mM KCl es abolido si el calcio se omite del medio de incubación (Fig. 17A), si la concentración de  $Hg^{++}$  se aumenta a 10 mM en presencia de 0.75 mM  $Ca^{++}$  (Fig. 17B), o si se añade 100  $\mu M$  EGTA y se omite el  $Ca^{++}$  del medio (Fig. 17C).

Estos resultados indican, por consiguiente, que rebanadas de hipotálamo incubadas en este sistema in-vitro responden a una dosis depolarizante de KCl liberando TRH al medio en forma dependiente de calcio externo. El efecto es reproducible y significativo:  $2.68 \pm 0.37$  veces sobre la basal ( $\bar{x} \pm EEM$ ,  $n = 28$ ,  $p < 0.005$ ) (Tabla 7). En relación a la liberación basal de TRH de hipotálamo, la dependencia de calcio no es clara (datos no mostrados). Estos resultados son similares a los reportados por otros autores (Charli et al., 1978; Joseph-Bravo et al., 1979; Maeda y Frohman, 1980; Warberg, 1982) y por lo tanto validan nuestro sistema de incubación para realizar el

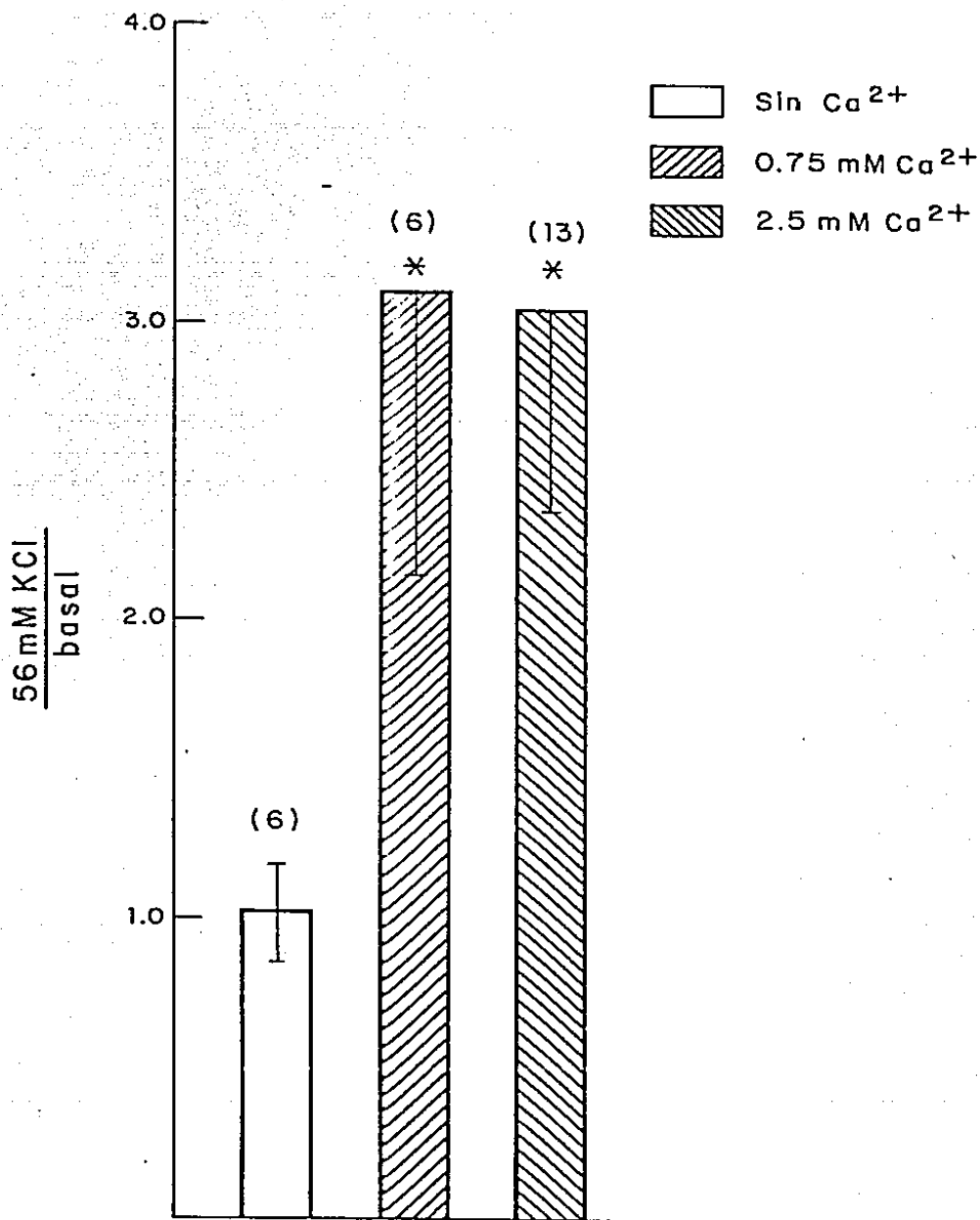
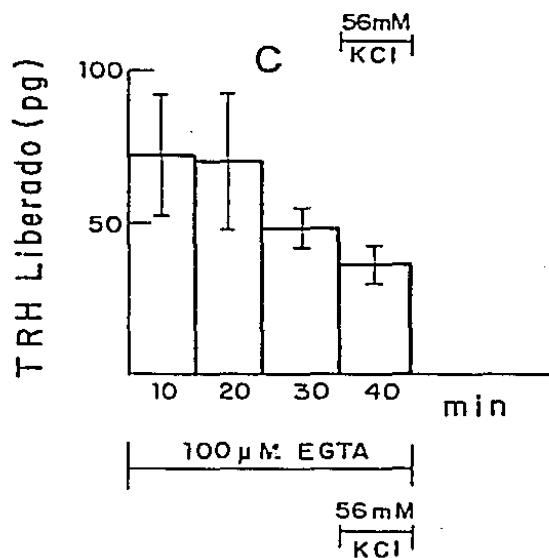
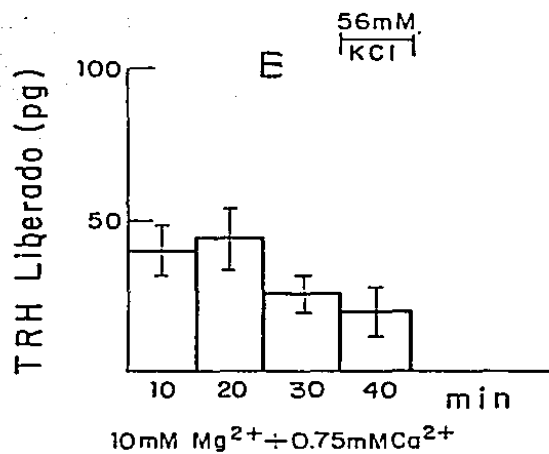
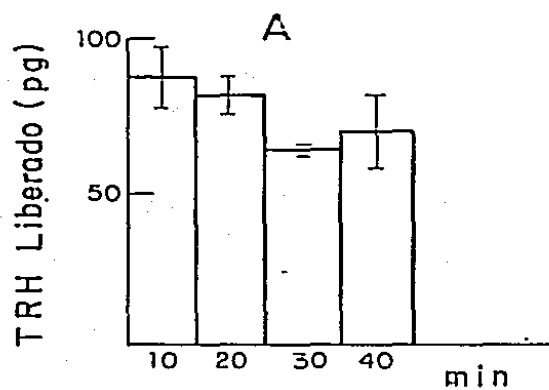


Fig. 16.- Efecto de calcio sobre la liberación de TRH estimulada por 56 mM KCl.- Rebanadas de hipotálamo se incubaron en ausencia de calcio o en presencia de 0.75 mM ó 2.5 mM  $Ca^{++}$ . El efecto del depolarizante en estas condiciones se evaluó como la cantidad de TRH liberada en presencia de 56 mM KCl / la cantidad de TRH liberada en condición basal ( $K^+$  / basal). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ). Entre paréntesis se indica el número de muestras.  
\* :  $p < 0.050$

Fig. 17.- Efecto de  $Mg^{++}$  y EGTA sobre la liberación de TRH de rebanadas de hipotálamo.- El tejido se incubó en ausencia de calcio (A) o en presencia de  $Mg^{++}$  (10 mM) con 0.75 mM  $Ca^{++}$  (B) o en presencia de EGTA (100  $\mu$ M) (C) y los niveles de TRH en el medio se detectaron por RIA. El efecto de 56 mM KCl, expresado como  $K^+$  / basal, fue de  $1.13 \pm 0.25$  (n=3),  $0.87 \pm 0.38$  (n=3) y  $0.76 \pm 0.04$  (n=3), respectivamente. Los datos son la media  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ).

Fig. 17



estudio regional en cerebro de rata.

Por otra parte, estudios sobre liberación de péptidos han sugerido la necesidad de incluir inhibidores de peptidasas en el medio de incubación con el fin de disminuir la probable degradación del péptido liberado (Rotsztein et al., 1976; Schaeffer et al., 1977a). Usando una concentración de bacitracina de  $2 \times 10^{-5}$  M - reportada como efectiva para inhibir la degradación de LHRH en presencia de tejido hipotalámico in vitro (Rotsztein et al., 1976) - , encontramos que, tanto la liberación basal de TRH como la estimulada por 56 mM KCl no son aumentadas por este inhibidor (Fig. 18B), y más bien hay una inhibición del efecto. Tanto en la condición control (Fig. 18A) como en presencia de bacitracina (Fig. 18B), el efecto del depolarizante fue significativo. Por lo tanto, los siguientes experimentos se hicieron en ausencia de bacitracina.

#### Liberación Regional de TRH endógeno en el Cerebro de Rata.

##### A. Liberación Basal de TRH.

Cuando se estudió la liberación de TRH en diferentes regiones del cerebro de rata encontramos una gran variabilidad en el porcentaje de TRH liberado en relación al contenido total de péptido en los tejidos al final de la incubación (Tabla 7). Las 4 regiones con mayor concentración de TRH (eminencia media, área preóptica, hipotálamo total y núcleo accumbens) presentaron los valores menores (0.90 - 1.32 %), y en la neurohipófisis, región con una alta concentración de TRH, el porcentaje de TRH liberable en relación al contenido total en el tejido fue de 10 %. En las regiones que poseen una concentración de



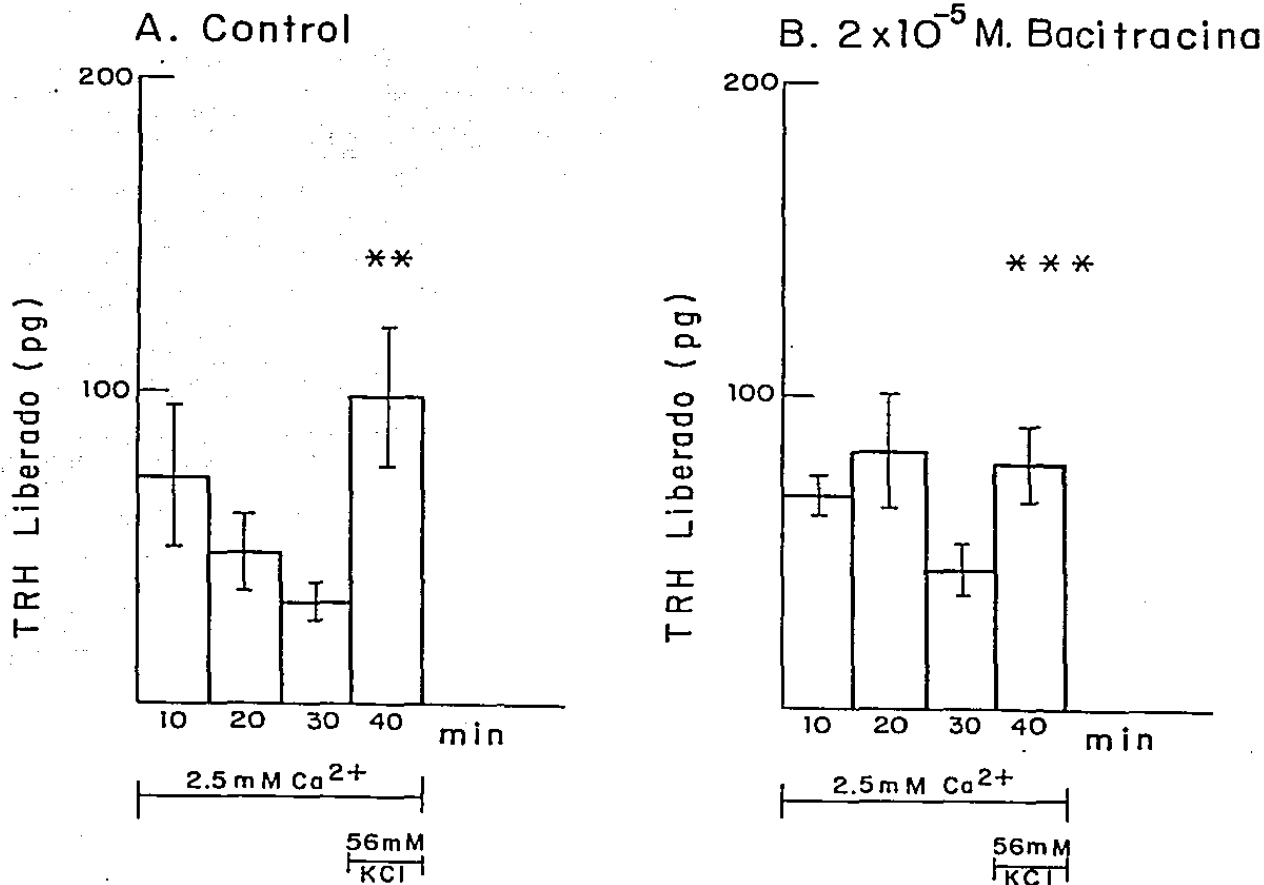


Fig. 18.- Efecto de bacitracina sobre la liberación de TRH de rebanadas de hipotálamo.- El tejido se incubó en KRB en presencia de 2.5 mM  $Ca^{++}$  y en ausencia (A) o en presencia de bacitracina ( $2 \times 10^{-5}$  M) (B). El efecto de 56 mM KCl ( $K^+$  / basal) fue de  $3.55 \pm 0.97$  (n=7) y  $1.97 \pm 0.26$  (n=8), respectivamente, expresado como  $\bar{x} \pm EEM$ .

\*\* :  $p < 0.010$

\*\*\* :  $p < 0.005$

TRH intermedia el porcentaje de TRH liberable en relación al contenido total en el tejido después de incubar varió de 3 a 20 %, incluyéndose áreas como la médula oblongada, la amígdala, el mesencéfalo, la corteza cerebral frontal (olfatoria), el puente, el estriado, la médula espinal (cervical) y el lóbulo olfatorio. En áreas con concentraciones bajas de TRH, el porcentaje de TRH liberable en relación al contenido total en los tejidos fue alto (de 14 a 17 %) y en algunas de ellas, como la retina, la glándula pineal, los hemisferios cerebelares y la corteza cerebral posterior, el TRH liberado está por debajo de los límites de sensibilidad de nuestro RIA (Tabla 8). Sólo en el caso de la adenohipófisis la cantidad de TRH detectada en los medios de incubación en relación al contenido total de péptido en el tejido después de la incubación fue superior al 20%.

No se observó correlación entre el porcentaje de TRH liberable en relación al contenido total de péptido en los tejidos después de incubar y la cantidad de masa incubada (Tabla 7). Tampoco se observó correlación entre la cantidad de TRH liberada en condiciones basales y el contenido de TRH en el tejido después de incubar (Tabla 8). Cuando se calcularon los porcentajes de TRH liberable en relación al contenido total de péptido en los tejidos sin incubar se observó que en la mayoría de los casos son comparables a los calculados cuando el tejido se incuba (Tabla 7), excepto la neurohipófisis, la amígdala, el mesencéfalo, la médula oblongada, la corteza cerebral frontal (olfatoria), la adenohipófisis y la vermis cerebelar, áreas en que el contenido total de péptido en el tejido después de la incubación resultó mayor que el contenido total en el tejido sin incubar.

B. Liberación de TRH Estimulada por 56 mM KCl.

Tabla 7.- Efecto de 56 mM KCl sobre la Liberación de TRH endógeno en el Cerebro de Rata.

Región	n	Proteína total ( mg )	TRH Liberado ( K <sup>+</sup> / basal )	% de TRH Liberable	
				A	B
Eminencia media	10	0.133	3.85 ± 0.84 **	0.90 ± 0.33	1.37
Area preóptica	5	0.991	4.62 ± 1.41 *	1.32 ± 0.31	1.07
Hipotálamo	28	1.631	2.68 ± 0.37 ***	1.12 ± 0.18	0.59
Núcleo accumbens	13	7.194	4.18 ± 0.65 ***	1.07 ± 0.32	1.63
Neurohipófisis	10	0.722	1.11 ± 0.16	10.37 ± 1.92	17.28
Lóbulo olfatorio	6	5.165	1.06 ± 0.29	20.15 ± 5.38	11.29
Amígdala	7	3.957	2.15 ± 0.55 *	4.58 ± 1.34	10.82
Médula espinal (cervical)	8	4.972	1.45 ± 0.21 *	14.20 ± 2.50	13.97
Mesencéfalo	8	8.852	2.29 ± 0.30 ***	4.89 ± 1.08	2.57
Puente	8	7.595	2.21 ± 0.59	5.90 ± 1.51	4.03
Médula oblongada	8	12.710	1.95 ± 0.31 *	2.67 ± 0.38	3.96
Corteza cerebral frontal (olfatoria)	7	11.253	1.91 ± 0.67	5.76 ± 1.36	12.44
Estriado	7	7.740	1.23 ± 0.12	10.51 ± 1.50	6.92
Glándula pineal	4	1.227	n.d.	n.d.	n.d.
Hipocampo	5	9.022	1.30 ± 0.21	14.24 ± 2.87	13.26
Adenohipófisis	7	3.351	0.82 ± 0.20	44.84 ± 7.30	n.d.
Corteza cerebral posterior	5	11.742	n.d.	n.d.	n.d.

Vermis cerebelar	10	15.518	2.05 ± 0.62	17.50 ± 4.55	26.28
Hemisferios cerebelares	4	6.100	n.d.	n.d.	n.d.
Retina	4	4.902	n.d.	n.d.	n.d.

Regiones enteras (adenohipófisis, neurohipófisis, amígdala, glándula pineal, retina, eminencia media y área preóptica) o rebanadas de 250  $\mu$  de grosor se incubaron en KRB y el TRH liberado al medio se cuantificó por RIA. El efecto de 56 mM KCl se expresa como la cantidad de TRH liberada en presencia de 56 mM KCl / la cantidad de TRH liberada en condición basal. El % de TRH liberable expresa la cantidad de TRH liberada en condición basal / el contenido total de TRH en el tejido después de la incubación ( A ) o sin incubar ( B ) por 100.

Proteína total = proteína medida en el tejido incubado.

\*\*\* :  $p < 0.005$ ; \*\* :  $p < 0.010$ ; \* :  $p < 0.050$ .

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ).

n = número de muestras.

n.d. = no detectado.

Tabla 8.- Liberación Basal de TRH y Niveles de Péptido en los Tejidos después de la incubación.

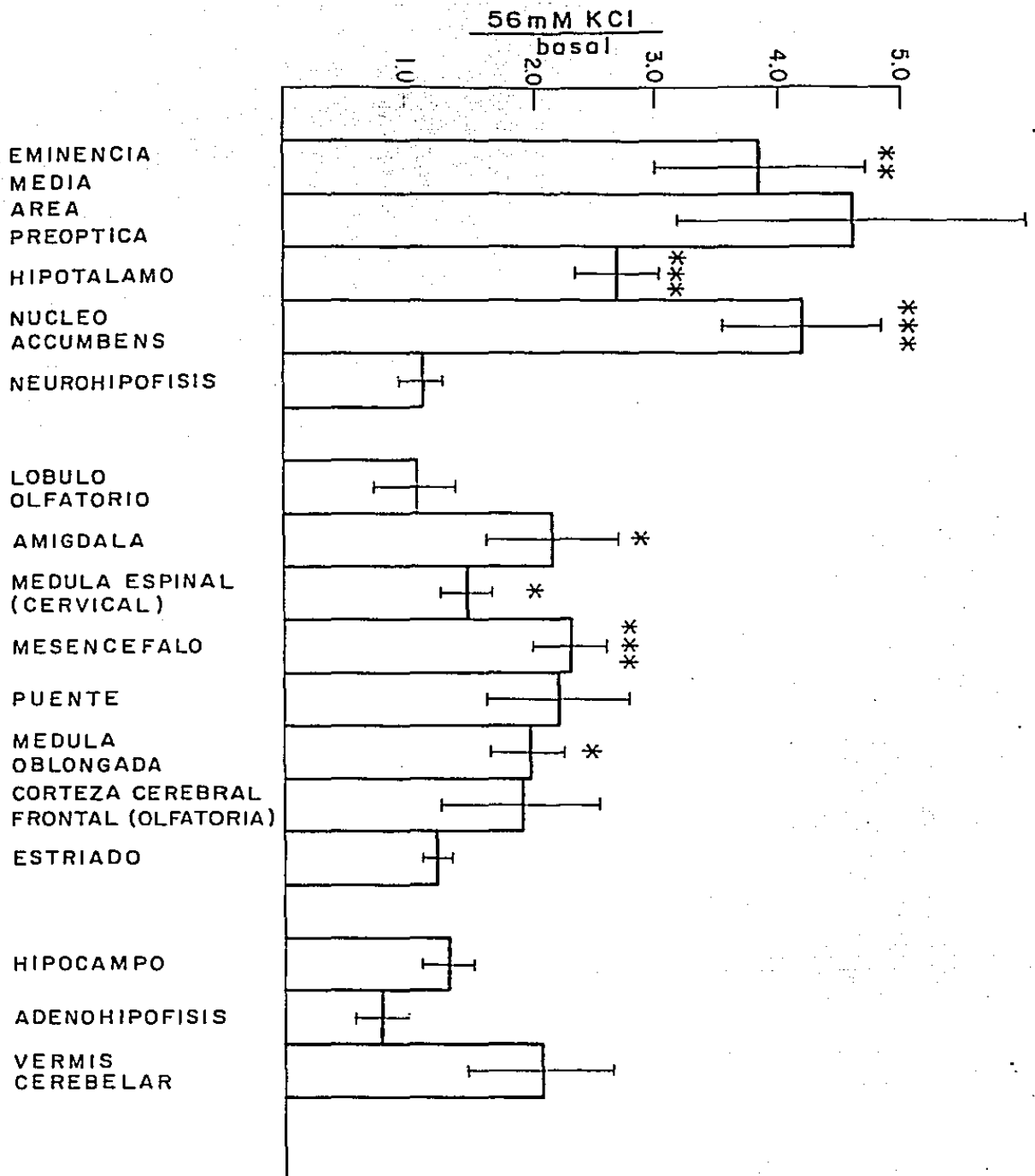
Región	n	TRH Liberado basalmente ( pg )	TRH en los tejidos contenido total / estructura ( pg )
Eminencia media	10	40 ± 9	6 080 ± 825
Area preóptica	5	84 ± 22	6 359 ± 464
Hipotálamo	28	32 ± 3	3 848 ± 392
Núcleo accumbens	13	140 ± 44	14 639 ± 1 411
Neurohipófisis	10	121 ± 22	1 197 ± 105
Lóbulo olfatorio	6	657 ± 144	3 507 ± 339
Amígdala	7	125 ± 36	2 810 ± 435
Médula espinal (cervical)	8	285 ± 51	2 121 ± 342
Mesencéfalo	8	63 ± 9	1 651 ± 297
Puente	8	72 ± 21	1 286 ± 130
Médula oblongada	8	145 ± 19	5 715 ± 558
Corteza cerebral frontal (olfatoria)	7	283 ± 75	5 010 ± 573
Estriado	7	78 ± 8	791 ± 118
Glándula pineal	4	n.d.	n.d.
Hipocampo	5	92 ± 13	703 ± 123
Adenohipófisis	7	152 ± 35	372 ± 83
Corteza cerebral post.	5	n.d.	n.d.
Vermis cerebelar	10	75 ± 12	518 ± 66
Hemisferios cerebelares	4	n.d.	n.d.
Retina	4	n.d.	n.d.

Las regiones se incubaron como se indica en los métodos y en el pie de la tabla 7. El TRH liberado basalmente y presente en los tejidos después de la incubación se cuantificó por RIA. Los datos se expresan como la media ± error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ). n = número de muestras. n.d. = no detectado.

Las 4 regiones del cerebro de rata que presentan la mayor concentración de TRH (eminencia media, área preóptica, hipotálamo y núcleo accumbens) mostraron un aumento significativo en la liberación de TRH bajo estimulación por 56 mM KCl (Tabla 7 y Fig. 19). El efecto fue mayor en el área preóptica, seguida del núcleo accumbens, la eminencia media y el hipotálamo. En la neurohipófisis se observó una variación muy grande en la respuesta a la estimulación ya que, de un total de 13 experimentos, en 3 de ellos fue imposible detectar TRH, y de los 10 restantes 6 fueron estimulaciones y 4 inhibiciones. De las regiones con concentraciones intermedias de TRH, sólo 4 de ellas respondieron significativamente a la estimulación, aunque el efecto fue menos intenso que en las áreas anteriores. En este grupo el efecto fue mayor en el mesencéfalo, seguido de la amígdala, la médula oblongada y la médula espinal (región cervical) (Tabla 7 y Fig. 19). No se observó efecto significativo del depolarizante en las otras regiones estudiadas. No pudimos evaluar la respuesta a la estimulación en la retina, la glándula pineal, los hemisferios cerebelares y la corteza cerebral posterior debido a que, como ocurrió en la liberación basal, los niveles de TRH no fueron detectados por nuestro RIA (Tabla 7).

No se observó correlación entre la magnitud de la respuesta a la depolarización ( $K^+$ / basal) y el contenido de TRH en el tejido después de la incubación o sin incubar. Cuando se calcularon los porcentajes de TRH liberable sobre la basal en relación al contenido total de péptido en el tejido después de incubar (Tabla 9), se observó que éstos variaron desde 1.13 en el hipotálamo hasta 5.80 en la médula espinal (cervical). Un análisis de correlación entre estos porcentajes y los obtenidos en liberación basal reveló una aparente correlación,

Fig. 19



con los siguientes parámetros :  $b = 1.7947$ ,  $m = 0.3058$ ,  $r = 0.8493$ .

#### Cinética de Liberación de TRH de Médula Espinal de Rata.

La gran variabilidad observada en la liberación basal de TRH en relación al contenido total de péptido en el tejido, y el hecho de que solo las regiones con porcentaje de liberación basal bajo (0.90 - 5 %) hayan respondido significativamente a la estimulación por 56 mM KCl sugería que, por alguna razón, el TRH presente en algunas áreas cerebrales es más susceptible de ser liberado que en otras. Por otra parte, el hecho de no haber obtenido respuesta a la estimulación en algunas áreas podría estar indicando un oscurecimiento del efecto por una basal alta debido a que el tejido no se ha estabilizado en el sistema en el momento de la estimulación. Por lo tanto, decidimos estudiar la cinética de liberación de TRH en médula espinal (cervical), región con un porcentaje de liberación basal de 14 % y una respuesta significativa a la depolarización por 56 mM KCl, con el objeto de determinar si prolongando el tiempo de estabilización en el sistema se obtendría una respuesta mayor.

La incubación de rebanadas de médula espinal (cervical) muestra que durante los primeros 10 min de incubación, la liberación de TRH es alta y disminuye ligeramente al llegar a los 20 min de incubación. Sin embargo, a partir de este momento, los niveles de TRH detectados en el medio se mantienen constantes durante toda la incubación (Fig. 20), a diferencia de lo que ocurrió en el hipotálamo (Fig. 14). En la Fig. 21 se muestra el efecto de 56 mM KCl después de estabilizar el tejido en el sistema por 50 o 70 min. Como se observa, la magnitud de la respuesta es similar y significativa en ambos casos, y comparable a la



Tabla 9.- Porcentaje de TRH Liberable por Estimulación con 56 mM KCl en algunas regiones del Cerebro de Rata.

Región	n	% de TRH Liberable
Eminencia media	10	1.45 ± 0.54
Area preóptica	5	3.47 ± 1.03
Hipotálamo	28	1.13 ± 0.27
Núcleo accumbens	13	1.71 ± 0.29
Amígdala	7	2.89 ± 1.13
Médula espinal (cervical)	8	5.80 ± 2.24
Mesencéfalo	8	4.58 ± 0.77
Médula oblongada	8	2.73 ± 1.10

Las regiones se incubaron como se indica en los métodos y en el pie de la tabla 7. El porcentaje de TRH liberable por estimulación con 56 mM KCl (sobre la basal) expresa la diferencia entre la cantidad de TRH liberado en presencia de 56 mM KCl y la cantidad de TRH liberada en condición basal / el contenido total de péptido en el tejido después de la incubación por 100. Los datos se expresan como la media ± error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ). n = número de muestras.

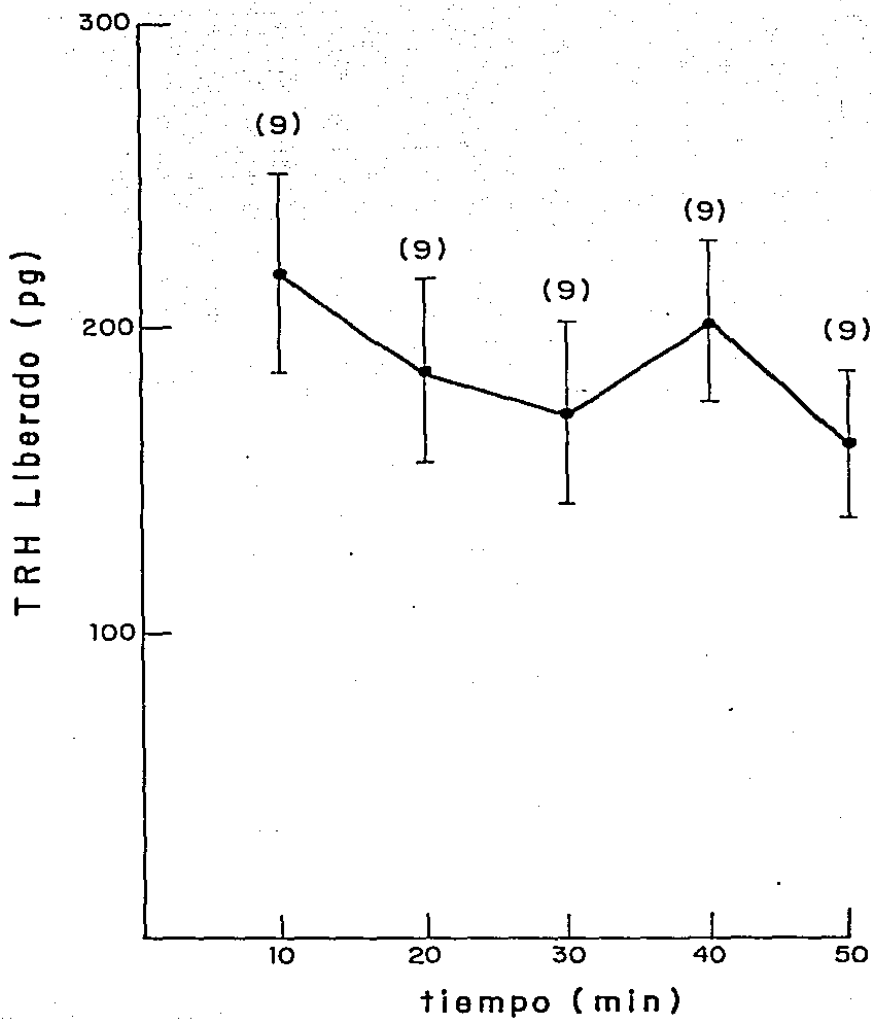


Fig. 20.- Cinética de liberación de TRH endógeno de médula espinal de rata.- Rebanadas de médula espinal (región cervical) se incubaron en KRB en presencia de 2.5 mM  $Ca^{++}$  y la cantidad de TRH liberada al medio de incubación se cuantificó por RIA. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ).

observada cuando el tejido se ha estabilizado por 30 min (Tabla 7 y Fig. 19). El porcentaje de TRH liberable en relación al contenido total de péptido en la médula después de incubar oscila alrededor de 9 - 15 % durante la incubación. Resultados similares se obtienen cuando estos porcentajes se calculan en relación al contenido de TRH en el tejido sin incubar (datos no mostrados).

Por lo tanto, en la médula espinal la liberación basal es constante durante gran parte de la incubación (el tejido se estabiliza muy pronto) y el efecto del depolarizante es muy semejante estimulando en cualquier momento de la incubación a partir de los 30 min.

Por otra parte, resalta el hecho de que en esta región el TRH total medido en el tejido al final de la incubación es superior a la diferencia que existe entre la cantidad inicial de TRH en el tejido sin incubar y los pg de TRH liberados durante la incubación. La diferencia es altamente significativa ( $p < 0.005$ ,  $n = 6$ ).

#### Caracterización del Material Liberado de Hipotálamo de Rata.

Con el objeto de establecer la identidad de la molécula liberada de hipotálamo de rata tanto en condición basal como estimulada por 56 mM KCl con TRH auténtico, los medios de incubación se diluyeron seriadamente y se sometieron a RIA. Como se muestra en la Fig. 22, en ambas condiciones se observó paralelismo con la curva estándar de TRH, lo cual sugiere una identidad inmunológica entre el material liberado y TRH.

Sin embargo, el criterio de identidad inmunológica no es suficiente para demostrar que el material liberado es TRH, por lo cual

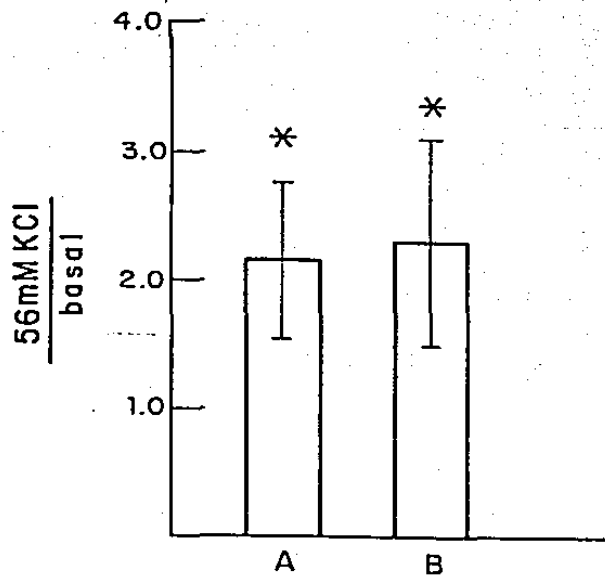


Fig. 21.- Efecto de 56 mM KCl sobre la liberación de TRH de médula espinal de rata.- Rebanadas de médula espinal (región cervical) se incubaron en KRB en presencia de  $Ca^{++}$  (2.5 mM) por 50 min (A) ó 70 min (B) e inmediatamente se estimuló con 56 mM KCl. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ) de  $K^+$  / basal. A =  $2.16 \pm 0.59$  (n=3), B =  $2.28 \pm 0.80$  (n=3).  
\* :  $p < 0.005$

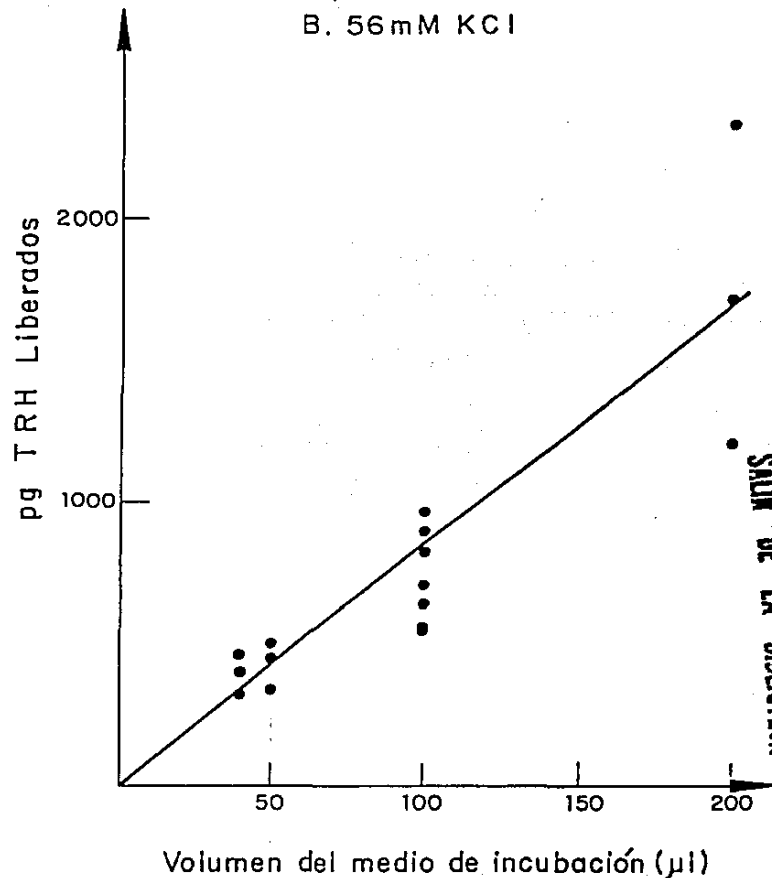
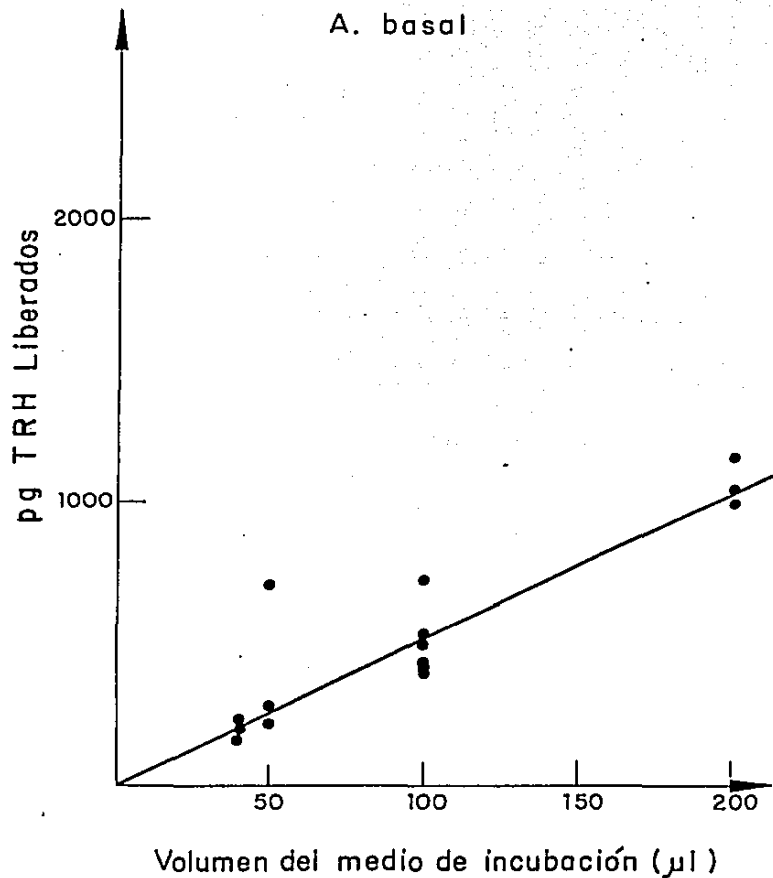


Fig. 22.- Curva de dilución de TRH liberado de rebanadas de hipotálamo.- Los medios de incubación (basal y estimulado) conteniendo el TRH liberado se extrajeron con metanol y se diluyeron seriadamente. La cantidad de TRH presente se midió por RIA.

ESTÁ TESIS NO DEBE  
SAIR DE LA BIBLIOTECA

los medios de incubación (basal y estimulado) se sometieron a HPLC fase reversa (C<sub>18</sub>) y los eluidos se analizaron por RIA. El análisis reveló la presencia de un pico inmunoreactivo con el mismo tiempo de retención que TRH sintético y [<sup>3</sup>H-pro]-TRH. Esto se observó tanto en condición basal como estimulada por 56 mM KCl (Figs. 23 y 24). Sin embargo, observamos variaciones considerables en el porcentaje de la inmunoreactividad que corresponde a TRH (Tabla 10), por lo que no podemos hacer estimaciones exactas sobre el porcentaje de la inmunoreactividad total que corresponde a TRH auténtico en estas condiciones, aunque aparentemente una gran parte del material liberado parece ser TRH.

En las Figs. 23 y 24 se observa también la presencia de dos moléculas inmunoreactivas adicionales que cruzan con el anticuerpo anti-TRH, y que son más hidrofóbicas que TRH. Estas moléculas no aparecieron siempre, y como se observa en la tabla 10 tampoco pueden hacerse estimaciones exactas sobre el porcentaje de la inmunoreactividad total a que corresponden estas dos moléculas. Cabe señalar que estas dos moléculas no se detectaron por RIA cuando se cromatografiaron muestras de KRB que no habían estado en contacto con el tejido.

El paso siguiente fue analizar la inmunoreactividad en el tejido con el fin de determinar si estas moléculas estaban presentes en el hipotálamo y se liberaban conjuntamente con TRH. Cuando los extractos hipotalámicos incubados se sometieron a HPLC y a RIA la mayor parte de la inmunoreactividad  $84.06 \pm 8.26 \%$ ,  $\bar{x} \pm \text{EEH}$ ,  $n = 4$ ) apareció en un solo pico que tiene el mismo tiempo de retención que TRH auténtico. Este patrón cromatográfico se observó en 5 ocasiones diferentes (Fig.

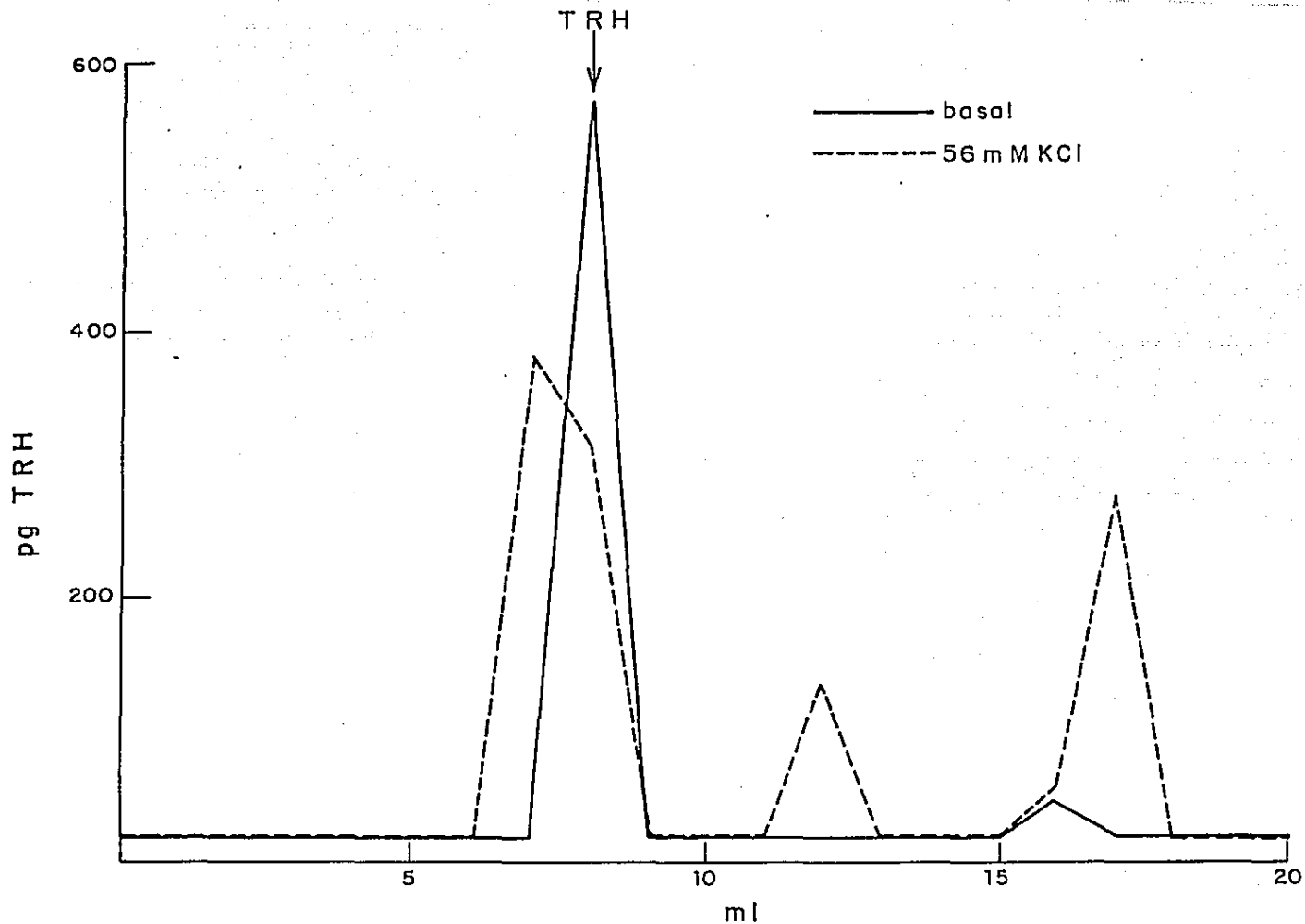


Fig. 23.- Perfil cromatográfico de la inmunoreactividad liberada de rebanadas de hipotálamo de rata.-Los medios de incubación (basal y estimulado) correspondientes a 10 hipotálamos se extrajeron con metanol (66% final), se purificaron por Sep-Pak C<sub>18</sub> y se sometieron a HPLC y RIA. El HPLC se realizó en un cromatógrafo Waters modular.

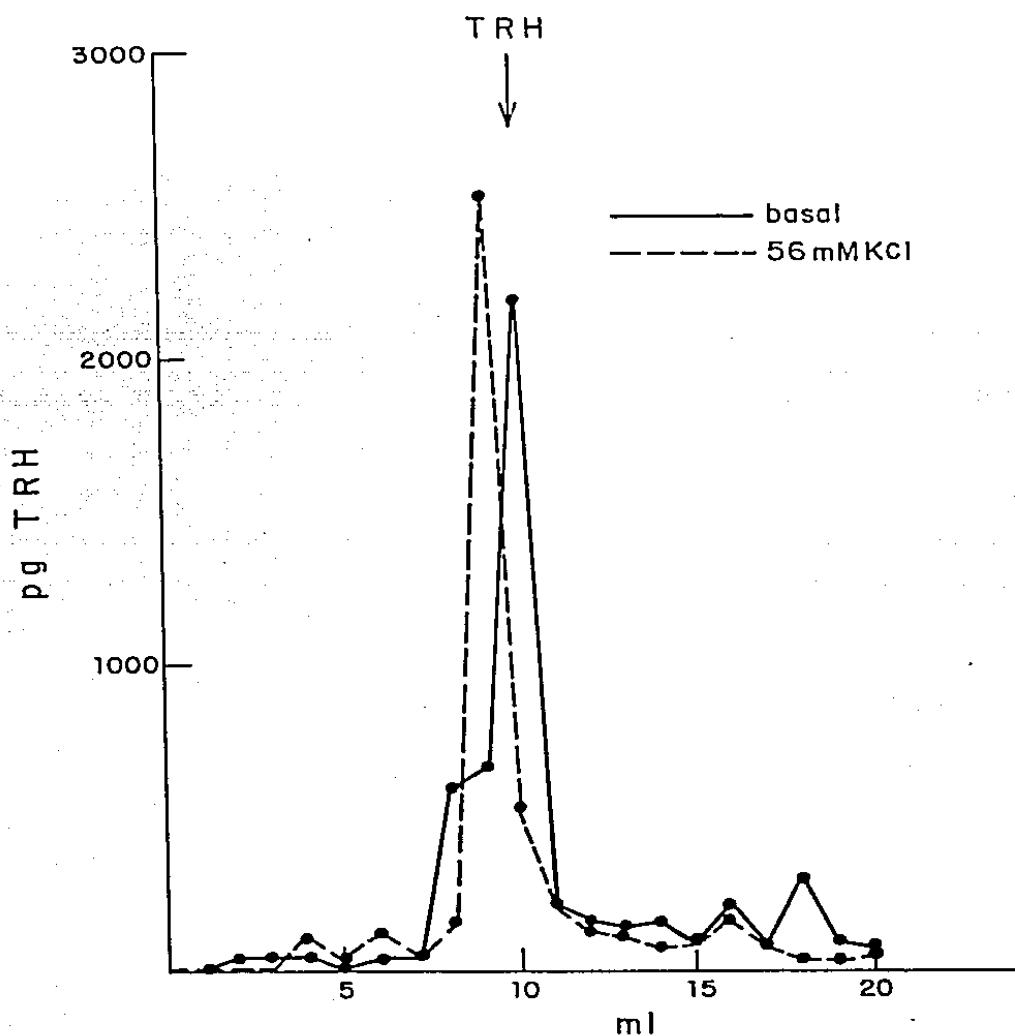


Fig. 24.- Perfil cromatográfico de la inmunoreactividad liberada de hipotálamo de rata.- Los medios de incubación (basal y estimulado) correspondientes a 9 hipotálamos se extrajeron en metanol (66% final), se purificaron por Sep-Pak C<sub>18</sub> y se sometieron a HPLC y RIA. El HPLC se realizó en un cromatógrafo Beckman 344.



Tabla 10.- Caracterización del Material Liberado de Hipotálamo de Rata por HPLC y RIA.

Experimento		IR Total en el cromatograma ( pg )	% del Total		
			Pico I ( TRH )	Pico II	Pico III
R A S A L	A	1 664	92.76	1.32	-
	B	310	92.22	-	7.78
	C *	309	28.19	-	-
	D	4 645	66.50	1.61	6.42
	E	1 135	-	73.73	16.38
	F *	1 762	41.09	33.41	3.25
50 mM KCl	A	1 269	86.84	13.16	-
	B	578	59.67	11.69	28.64
	C	152	63.83	-	36.17
	D	4 014	72.53	2.49	1.99
	E	1 977	-	88.70	6.30
	F *	1 623	82.56	-	4.77

Diez (Experimentos A, B y C) ó 9 (Experimentos D, E y F) hipotálamos de rata se incubaron en KRB por 30 min e inmediatamente se estimularon con 56 mM KCl. Los medios de incubación se extrajeron con metanol (66 % final) y se sometieron a Sep-Pak C<sub>18</sub>, HPLC y RIA. Las muestras de los experimentos A, B y C se analizaron en un cromatógrafo HPLC Waters modular y los tiempos de retención obtenidos fueron: Pico I (TRH) = 7 - 8 min, Pico II = 12 - 13 min, Pico III = 15 - 16 min. Las muestras de los experimentos D, E y F se analizaron en un cromatógrafo HPLC Beckman 340 y los tiempos de retención obtenidos fueron: Pico I (TRH) = 9 - 10 min, Pico II = 14 - 16 min, Pico III = 18 - 20 min.

\* - En los experimentos C (basal) y F (basal y 56 mM KCl) se detectaron otros picos inmunoreactivos que no correspondieron a ninguno de los señalados. En C se detectó un pico inmunoreactivo con tiempo de retención = 9 min (71.81 % de la inmunoreactividad total). En F (basal) los picos inmunoreactivos se detectaron con un tiempo de retención de 22, 33 y 37 min (22 % de la inmunoreactividad total). En F (56 mM KCl) se detectaron picos pequeños que corresponden al 12.67 % de la inmunoreactividad total.  
IR - inmunoreactividad.

25). Como se observa, el 20 % restante de la inmunoreactividad total se distribuye como un barrido en el cromatograma, sin que se pueda diferenciar claramente la presencia de las dos moléculas inmunoreactivas que aparecen en los medios de incubación. Con el objeto de estudiar la posibilidad de que estas dos moléculas estuvieran presentes en el tejido pero que "desaparecieran" por efecto de la incubación del mismo, extractos hipotalámicos de tejidos sin incubar se sometieron a HPLC y RIÁ. Como se observa en la Fig. 26, el patrón cromatográfico es similar al obtenido cuando los tejidos son incubados. En este caso  $84.98 \pm 3.66 \%$  ( $\bar{x} \pm EEM$ ,  $n = 3$ ) de la inmunoreactividad total corresponde a TRH auténtico. Asimismo, el 20 % de la inmunoreactividad restante se distribuye también como un barrido. Estos resultados indican, por lo tanto, que en el hipotálamo de rata aproximadamente el  $85 \pm 4 \%$  ( $\bar{x} \pm EEM$ ,  $n = 7$ ) de la inmunoreactividad detectada por RIÁ es TRH. Queda por aclarar a que corresponde el 15 % restante.

Las dos moléculas inmunoreactivas adicionales a TRH detectadas en los medios de incubación no corresponden a metabolitos de TRH ya que, como se muestra en la tabla 5, éstos no cruzan con el anticuerpo de TRH. Además, los tiempos de retención de los metabolitos de TRH en HPLC no coinciden con ninguno de los picos inmunoreactivos (A. Báez, comunicación personal), ya que los tiempos de retención son menores o similares al de TRH en este sistema cromatográfico.

Con el objeto de determinar la naturaleza de las dos moléculas inmunoreactivas que aparecen en los medios de incubación de rebanadas de hipotálamo, diseñamos algunas estrategias experimentales tendientes a probar las siguientes hipótesis :

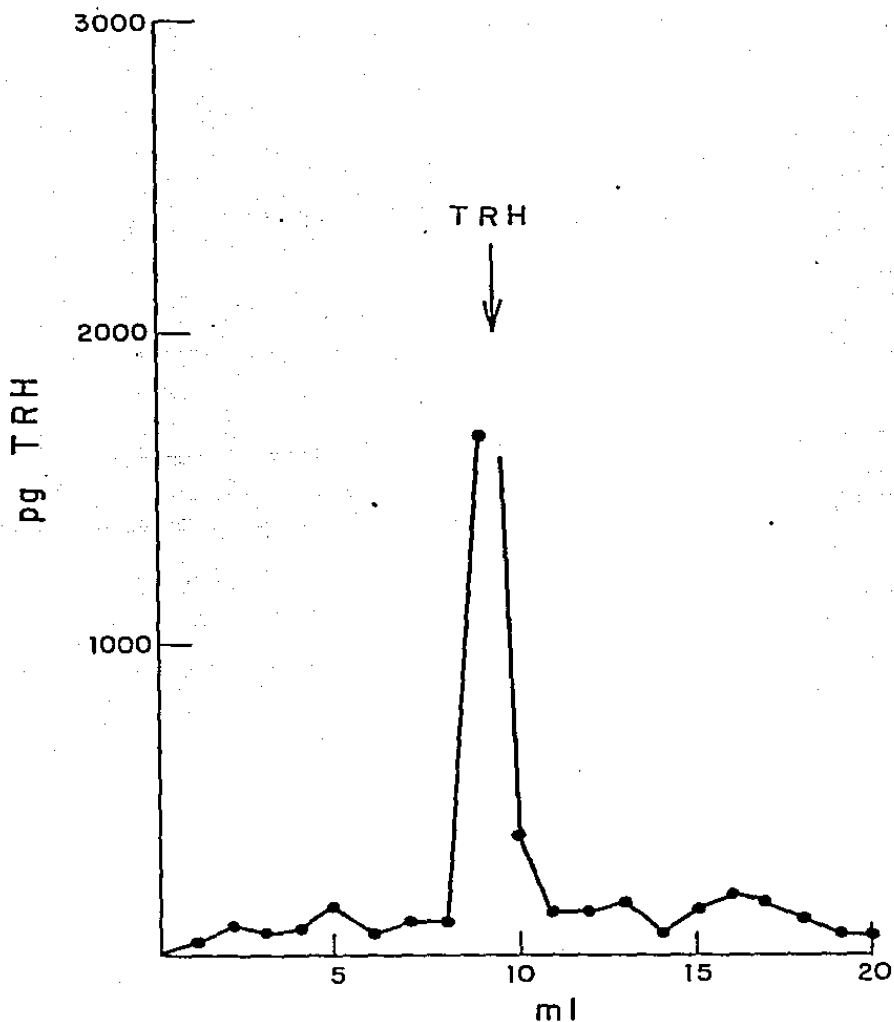


Fig. 25.- Perfil cromatográfico de la inmunoreactividad presente en hipotálamo de rata después de la incubación.- Rebanadas de hipotálamo se incubaron en KRB en presencia de  $Ca^{++}$  (2.5mM) y al final de la incubación el tejido se sonicó en metanol (66%). Los extractos equivalentes a un hipotálamo se purificaron por Sep-Pak  $C_{18}$  y se sometieron a HPLC y RIA. El HPLC se realizó en un Cromatógrafo Beckman 344.

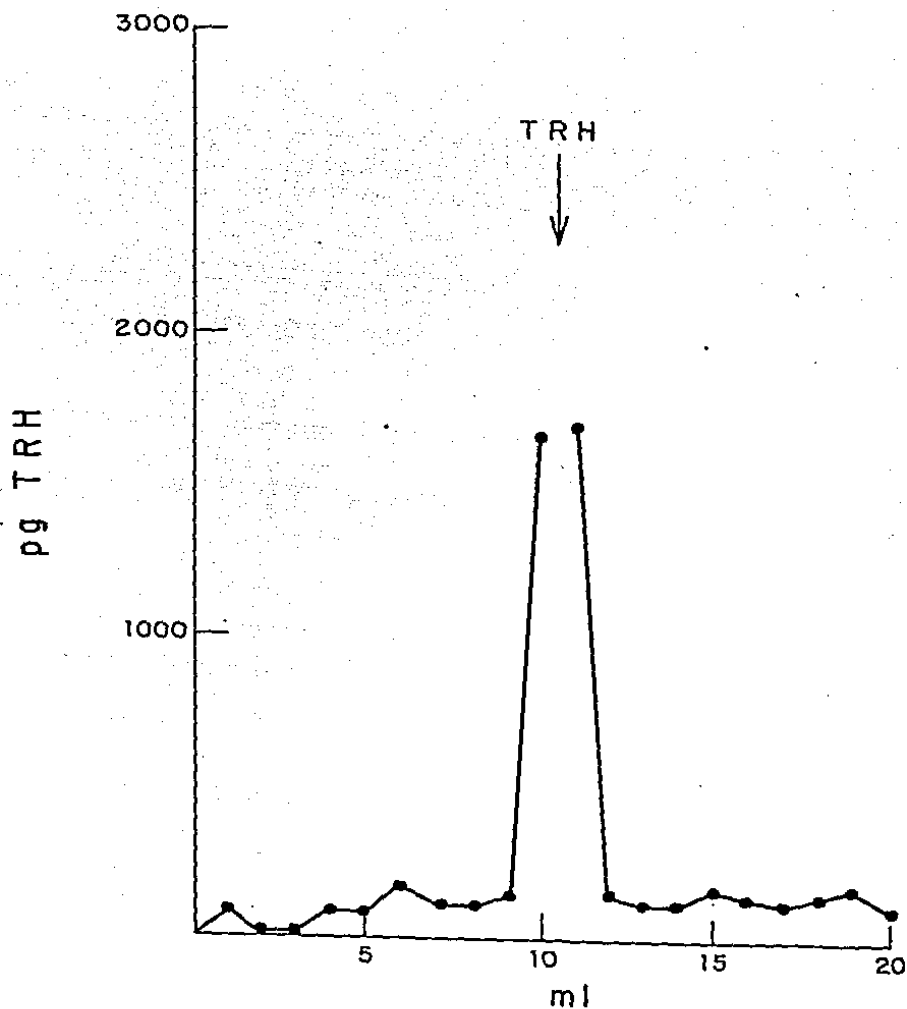


Fig. 26.- Perfil cromatográfico de la inmunoreactividad endógena de hipotálamo de rata.- Inmediatamente después de la disección, el tejido se sonicó en metanol (66%) y los extractos equivalentes a un hipotálamo se purificaron por Sep-Pak C<sub>18</sub> y se sometieron a HPLC y RIA. EL HPLC se realizó en un cromatógrafo Beckman 344.

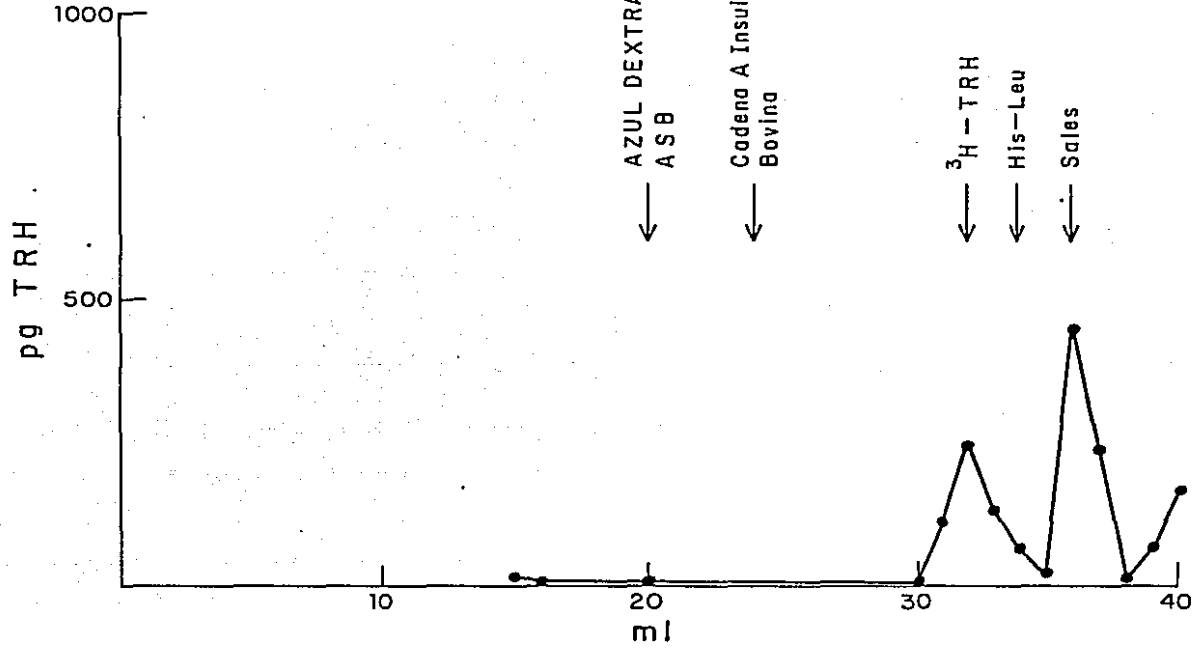
- 1) Intermediarios del procesamiento del precursor de TRH.
- 2) Moléculas diferentes a TRH, que cruzan con el anticuerpo anti-TRH.
- 3) Modificación del TRH liberado en el espacio extracelular.

Para probar la hipótesis de que estas moléculas pudieran corresponder a intermediarios del procesamiento del precursor de TRH, sometimos tanto los medios de incubación (basal y estimulado) como los extractos hipotalámicos a cromatografía en Sephadex G-25-40, con el objeto de determinar si el anticuerpo utilizado es capaz de reconocer sustancias de alto peso molecular. Tanto en los medios de incubación (basal y estimulado) (Fig. 27 A y B) como en los extractos hipotalámicos (Fig. 28), se observó un solo pico inmunoreactivo que comigra con TRH estándar, y no se detectaron sustancias de alto peso molecular. Los cromatogramas que se muestran fueron similares en 6 (medios de incubación) y en 5 (tejidos) ocasiones distintas.

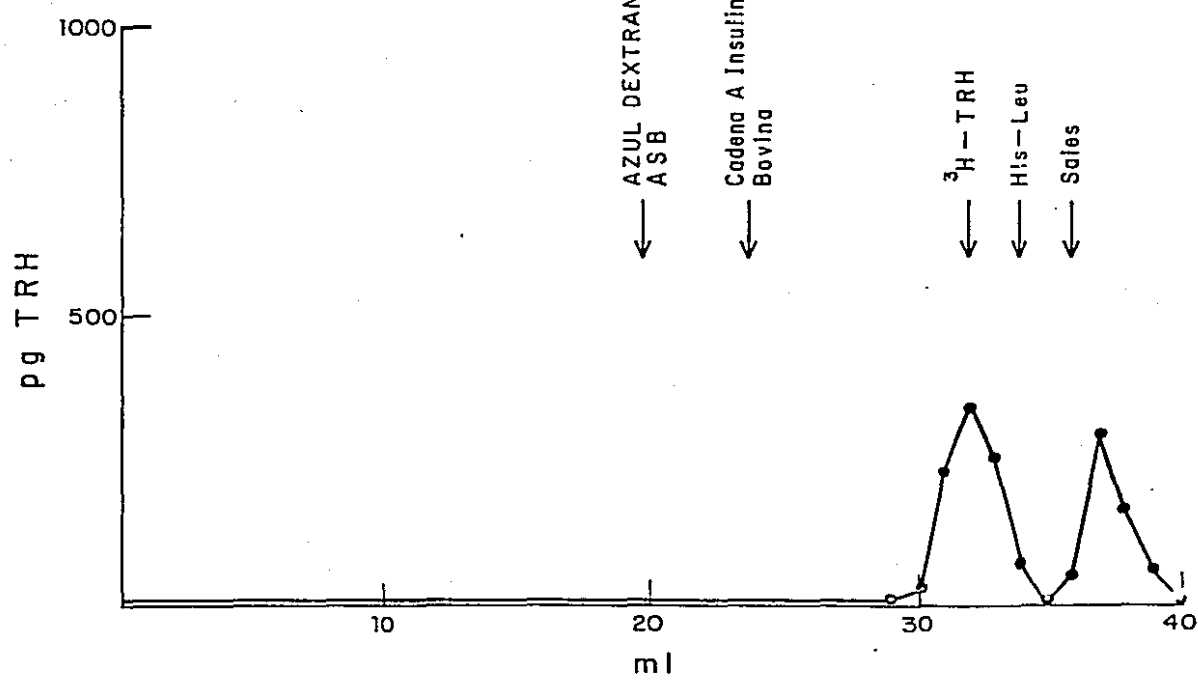
Cuando muestras de KRB que no habían estado en contacto con el tejido se sometieron al mismo tipo de cromatografía, no apareció ninguna molécula con el mismo volumen de elución que TRH. En este caso, solo aparece un pico que corresponde a las sales del medio (Fig. 29) (una alta concentración de sal rompe la interacción antígeno-anticuerpo y produce un falso positivo), que también está presente en los cromatogramas de los medios de incubación (Fig. 27) pero no en los de los tejidos (Fig. 28). Además, cuando se corrió un blanco de 20 % ácido acético (Fig. 29) se comprobó que no aparece el pico que corresponde a las sales del medio y que no se retiene prácticamente nada de TRH en la columna proveniente de cromatografías previas.

Fig. 27

A. Basal



B. 56mM KCl



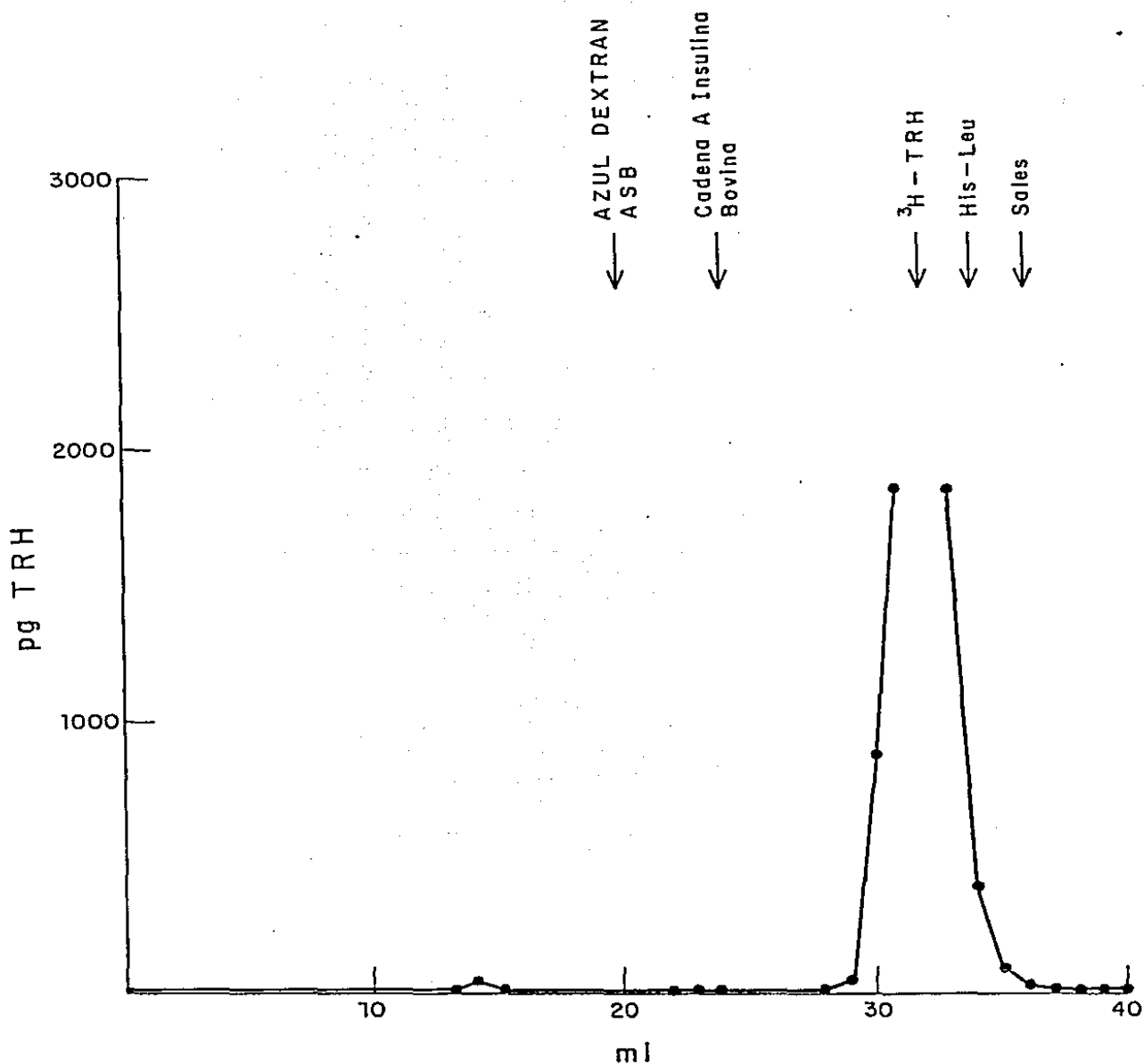


Fig. 28.- Perfil cromatográfico de la inmunoreactividad presente en hipotálamo después de la incubación : Filtración en gel.- El tejido se incubó como se describe en el pie de la Fig. 25 y se sonicó en metanol (66%). Los residuos de los extractos equivalentes a 3 hipotálamos se resuspendieron en ácido acético (20%) y se cromatografiaron en una columna de Sephadex G-25-40. Los residuos de los eluidos correspondientes se sometieron a RIA.



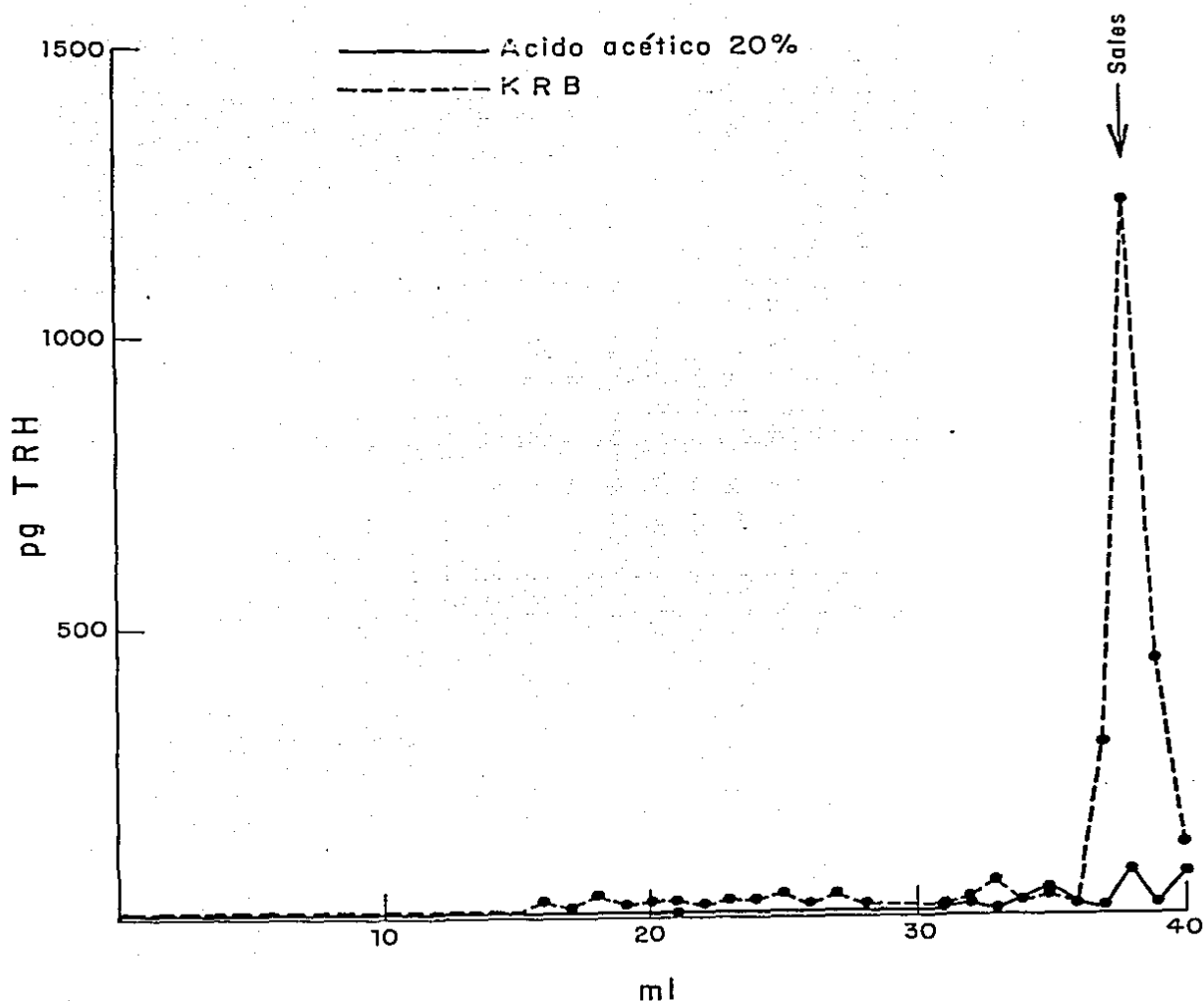


Fig. 29.- Perfil cromatográfico de una muestra de KRB y un blanco de ácido acético 20% : Filtración en gel.- Muestras de KRB no incubadas se procesaron como los medios de incubación de hipotálamo y se sometieron a cromatografía en una columna de Sephadex G-25-40 y RIA. Se muestra también la cromatografía de un blanco de ácido acético 20%.

Estos datos sugieren, por lo tanto, que los dos picos inmunoreactivos adicionales en los medios de incubación son de un peso molecular similar a TRH.

Cuando se determinó el tiempo de retención en HPLC de un análogo de TRH que tiene una extensión en el extremo COOH terminal (pGlu-His-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) (Tabla 11), se observó que éste no coincide con el tiempo de retención de las dos moléculas inmunoreactivas detectadas en los medios de incubación (Fig. 24), aunque este análogo cruce con el anticuerpo de TRH a concentraciones de 0.5 ng (Tabla 5). Por lo tanto, los dos picos inmunoreactivos adicionales a TRH en los medios de incubación no parecen corresponder a una extensión corta del TRH en su extremo COOH terminal. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que pudieran corresponder a otro tipo de precursor.

Por otra parte, cuando se analizaron los tiempos de retención en HPLC de análogos de TRH, ya sea con una sustitución en el residuo de histidina ([Phe<sup>2</sup>]-TRH) o de prolina (pGlu-His-Gly-NH<sub>2</sub>), o con otra modificación ([3-Me-His<sup>2</sup>]-TRH y pGlu-His-Gly) (Tabla 11), encontramos que sólo el de [Phe<sup>2</sup>]-TRH parece corresponder al tiempo de retención del segundo pico inmunoreactivo de los medios de incubación (Tabla 10). pGlu-His-Gly-NH<sub>2</sub> y pGlu-His-Gly cruzan pobremente con el anticuerpo de TRH, mientras que [Phe<sup>2</sup>]-TRH y [3-Me-His<sup>2</sup>]-TRH cruzan fuertemente. El tiempo de retención del último está muy cerca del de TRH (Tabla 11) y por lo tanto ninguna de las dos moléculas inmunoreactivas de los medios parece corresponder a este análogo. Aunque el tiempo de retención del [Phe<sup>2</sup>]-TRH parece corresponder al segundo pico inmunoreactivo de los medios, el criterio de movilidad cromatográfica no es suficiente para establecer la naturaleza de estas

Tabla II.- HPLC de algunos Análogos de TRH.

Análogos	t r ( min )
TRH	9.46
[Phe <sup>2</sup> ]-TRH	14.03
[3-His <sup>2</sup> ]-TRH	9.00
p-Glu-His-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>	7.95
p-Glu-His-Gly-NH <sub>2</sub>	5.07
p-Glu-His-Gly	6.00

Los tiempos de retención ( t r ) de los análogos de TRH se determinaron en un cromatógrafo HPLC Beckman 340.

moléculas.

La última hipótesis que estudiamos propone que las moléculas adicionales a TRH que aparecen en los medios de incubación provienen de TRH liberado que es modificado extracelularmente por enzimas no peptidásicas. Con el fin de probar esta hipótesis, incubamos rebanadas de hipotálamo en presencia de [ $^3\text{H}$ -pro]-TRH (2 nM) y analizamos por HPLC la radioactividad presente tanto en los medios como la asociada a los tejidos incubados o sin incubar. En los medios de incubación, el  $96.05 \pm 0.43 \%$  ( $\bar{x} \pm \text{EEH}$ ,  $n = 3$ ) (liberación basal) (Fig. 30A) y el  $95.17 \pm 1.08 \%$  ( $\bar{x} \pm \text{EEH}$ ,  $n = 3$ ) (liberación estimulada) (Fig. 30B) de la radioactividad total coincidió con el tiempo de retención de TRH. En los tejidos incubados, el  $84.57 \pm 3.13 \%$  ( $\bar{x} \pm \text{EEH}$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 31A) correspondió a TRH. Cuando el tejido se puso en contacto con [ $^3\text{H}$ -pro]-TRH sin incubar (Fig. 31B), y a una muestra de KRB se le añadió [ $^3\text{H}$ -pro]-TRH (no se muestra), se observó que el 97.35 % ( $n = 2$ ) y el 94.76 % ( $n = 2$ ) de la radioactividad total respectivamente, corresponde a TRH.

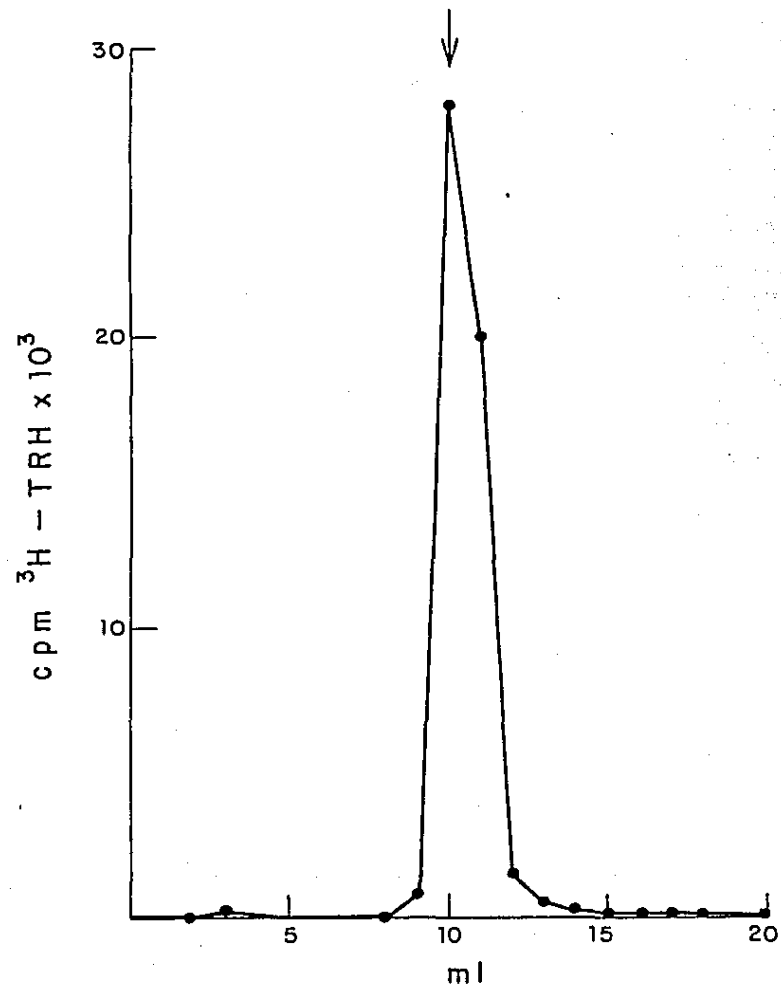
Puesto que no pudimos observar ninguna modificación de [ $^3\text{H}$ -pro]-TRH por rebanadas de hipotálamo en estas condiciones, realizamos experimentos variando tanto el tiempo de incubación como la concentración del sustrato. Los medios de incubación correspondientes a liberación basal y los extractos hipotalámicos se sometieron a HPLC y se analizó la distribución de la radioactividad en el cromatograma. Cuando rebanadas de hipotálamo se incubaron por 20 min en KRB y se transfirieron a KRB conteniendo [ $^3\text{H}$ -pro]-TRH por 15 min a concentraciones finales de 2nM (Fig. 32A), 50 nM (Fig. 32B) o 1000 nM (Fig. 32C), observamos que el 98.14 % ( $n = 2$ ), el 97.52 % ( $n = 2$ ) y el

- Fig. 30.- Perfil cromatográfico de  $^3\text{H}$ -TRH incubado en presencia de rebanadas de hipotálamo.-  $^3\text{H}$ -TRH (200,000 cpm, basal; o 100,000 cpm, estimulado) (concentración final 2 nM) se incubó en presencia de rebanadas de hipotálamo y los medios de incubación basal (A) o estimulado (B) se extrajeron y purificaron como se describe en métodos. Los residuos se sometieron a HPLC y la radioactividad en las fracciones se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-7800. El HPLC se hizo en un cromatógrafo Beckman 344.
- Fig. 31.- Perfil cromatográfico de  $^3\text{H}$ -TRH asociado a rebanadas de hipotálamo.-  $^3\text{H}$ -TRH (2 nM final) se incubó en presencia de rebanadas de hipotálamo (A) o se añadió inmediatamente al tejido sin incubar (B). Las muestras se extrajeron y purificaron como se describe en métodos y los residuos se sometieron a HPLC. La radioactividad en las fracciones se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-7800. El HPLC se hizo en un cromatógrafo Beckman 344.
- Fig. 32.- Perfil cromatográfico de  $^3\text{H}$ -TRH incubado en presencia de rebanadas de hipotálamo.- 200,000 cpm de  $^3\text{H}$ -TRH se incubaron en presencia de rebanadas de hipotálamo a concentraciones finales de 2 (A), 50 (B) o 1000 nM (C) durante 15 min después de haber estabilizado el tejido en el sistema por 20 min. Los medios de incubación se extrajeron y se analizaron por HPLC como se indica en la Fig. 30.
- Fig. 33.- Perfil cromatográfico de  $^3\text{H}$ -TRH incubado en presencia de rebanadas de hipotálamo.- 200,000 cpm de  $^3\text{H}$ -TRH se incubaron en presencia de rebanadas de hipotálamo a concentraciones de 2 (A), 50 (B) o 1000 nM (C) durante 40 min después de estabilizar el tejido en el sistema por 20 min. Los medios de incubación se extrajeron y se analizaron por HPLC como se indica en la Fig. 30.
- Fig. 34.- Perfil cromatográfico de  $^3\text{H}$ -TRH asociado a rebanadas de hipotálamo.- 200,000 cpm de  $^3\text{H}$ -TRH se incubaron en presencia de rebanadas de hipotálamo a concentraciones finales de 2 (A), 50 (B) o 1000 nM (C) durante 15 min después de estabilizar el tejido en el sistema por 20 min. Los tejidos se extrajeron y se analizaron por HPLC como se indica en la Fig. 31.
- Fig. 35.- Perfil cromatográfico de  $^3\text{H}$ -TRH asociado a rebanadas de hipotálamo.- 200,000 cpm de  $^3\text{H}$ -TRH se incubaron en presencia de rebanadas de hipotálamo a concentraciones de 2 (A), 50 (B) o 1000 nM (C) durante 40 min después de estabilizar el tejido en el sistema por 20 min. Los tejidos se extrajeron y se analizaron por HPLC como se indica en la Fig. 31.

Fig. 30

A. Basal

TRH



B. 56 mM KCl

TRH

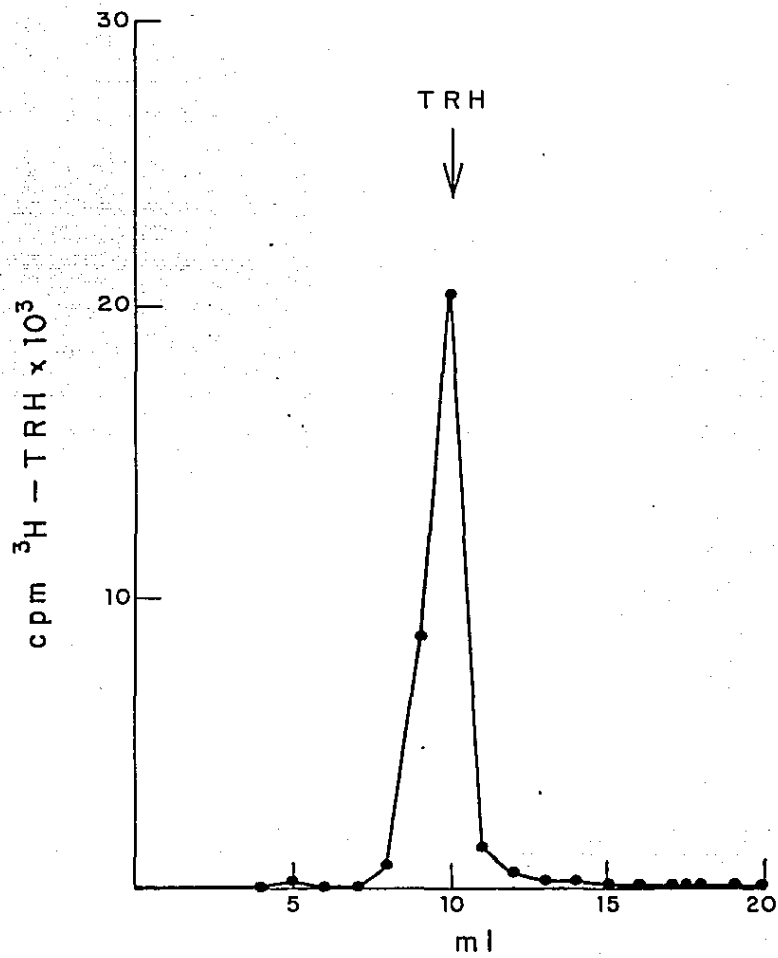
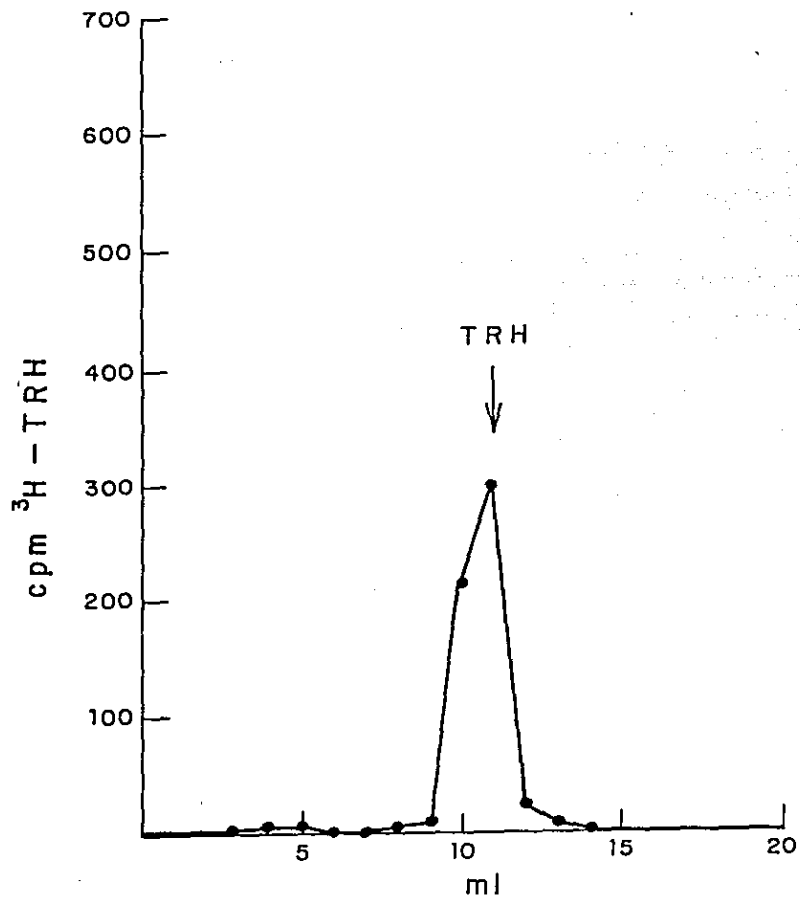
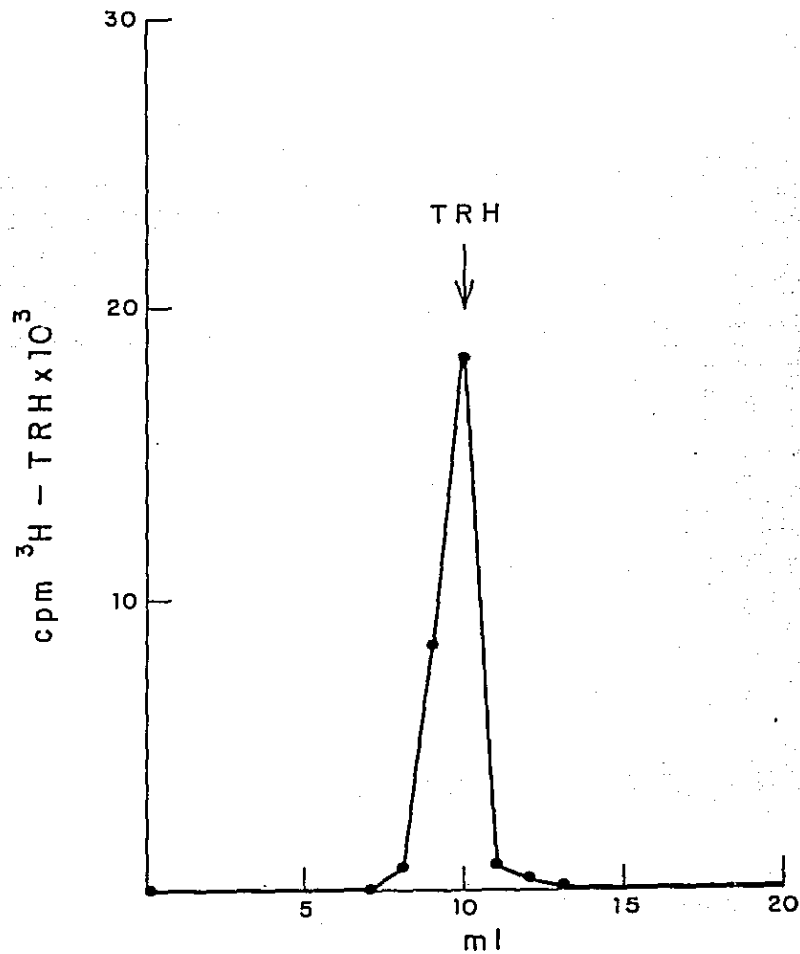


Fig. 31

A. Hipotálamos incubados



B. Hipotálamos sin incubar



98.34 % (n = 2) respectivamente, de la radioactividad total en el cromatograma de HPLC corresponde a TRH. Asimismo, cuando las rebanadas de hipotálamo se incubaron por 20 min en KRB y se transfirieron a KRB conteniendo [ $^3\text{H}$ -pro]-TRH por 40 min a concentraciones finales de 2 nM (Fig. 33A), 50 nM (Fig. 33B) o 1000 nM (Fig. 33C), el 97.18 % (n = 2), 97.18 % (n = 2) y 96.72 % (n = 2) respectivamente, de la radioactividad total en el cromatograma correspondió a TRH.

Por otra parte, el análisis de la radioactividad en los extractos hipotalámicos sometidos a HPLC reveló los siguientes resultados: cuando el tejido fue incubado por 15 min en presencia de  $^3\text{H}$ -pro -TRH a concentraciones finales de 2 nM (Fig. 34A), 50 nM (Fig. 34B) o 1000 nM (Fig. 34C), el 83.30 % (n = 2), 79.48 % (n = 2) y 83.60 % (n = 2) respectivamente, de la radioactividad total tuvo el mismo tiempo de retención que TRH. Cuando el tejido fue incubado por 40 min en presencia de  $^3\text{H}$ -pro -TRH a concentraciones finales de 2 nM (Fig. 35A), 50 nM (Fig. 35B) o 1000 nM (Fig. 35C), el 68.68 % (n = 2), 77.43 % (n = 2) y 73.51 % (n = 2) respectivamente, correspondió a TRH.

Estos resultados indican aparentemente, que no ocurre una modificación extracelular de TRH liberado, ya que el análisis por HPLC de los medios de incubación revela en todos los casos la presencia de un solo pico que tiene el mismo tiempo de retención que TRH sintético y que constituye el 95 % o más de la radioactividad total. En los tejidos también aparece un solo pico que comigra con TRH sintético. El porcentaje de radioactividad que comigra con TRH es de aproximadamente el 83 % cuando el tejido se incubaba por 15 min, y de 72 % cuando se incubaba por 40 min. El resto de la radioactividad (aproximadamente el



20 %) está distribuido a lo largo de todo el cromatograma y una buena parte corresponde a metabolismo de TRH por peptidasas con aparición de radioactividad con tiempo de retención menor o similar al de TRH (Figs. 34 y 35).

Fig. 32

MEDIOS DE INCUBACION (35 min)

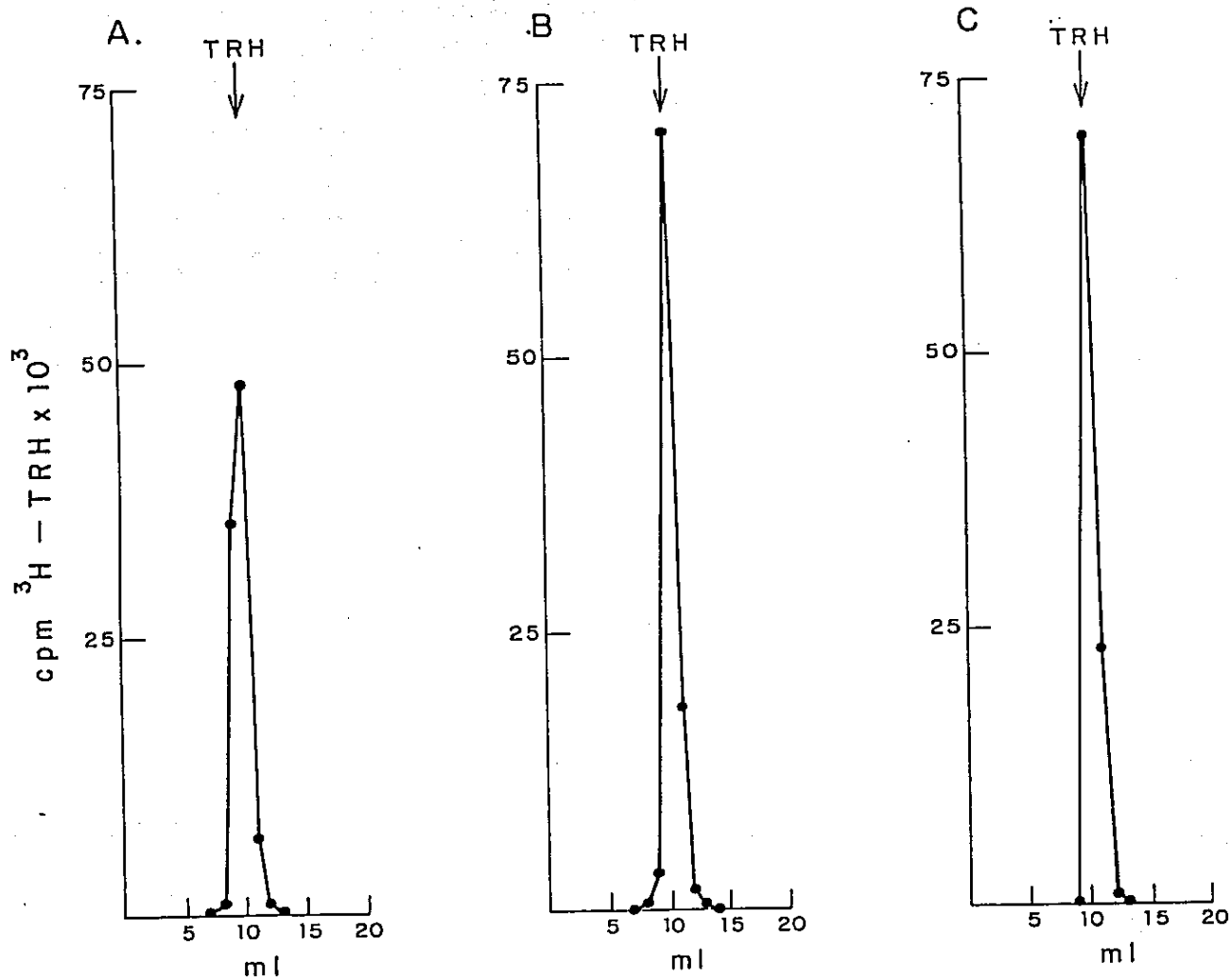
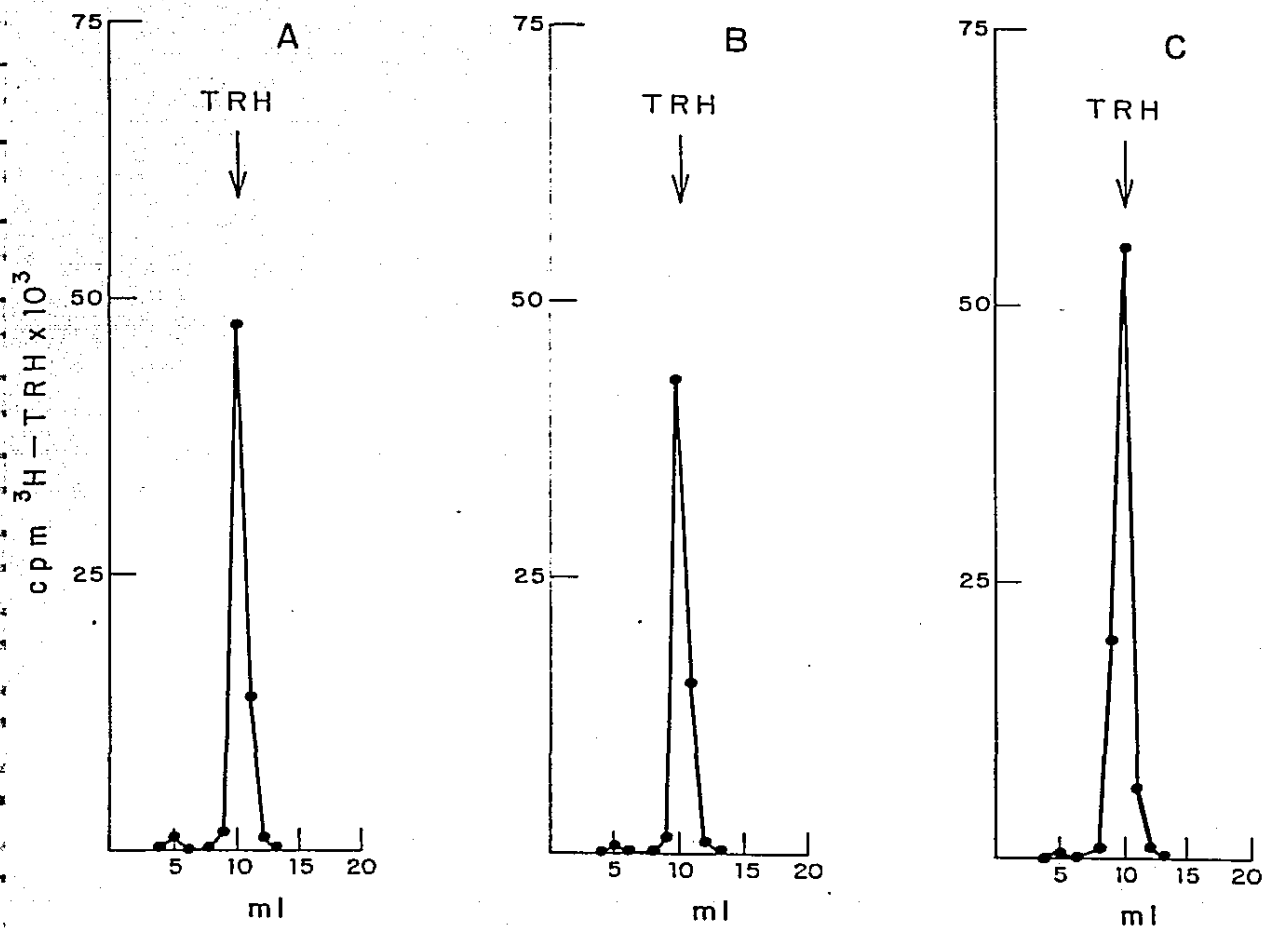


Fig. 33

MEDIOS DE INCUBACION (60 min)



TEJIDOS (35 min)

Fig. Fig. 34

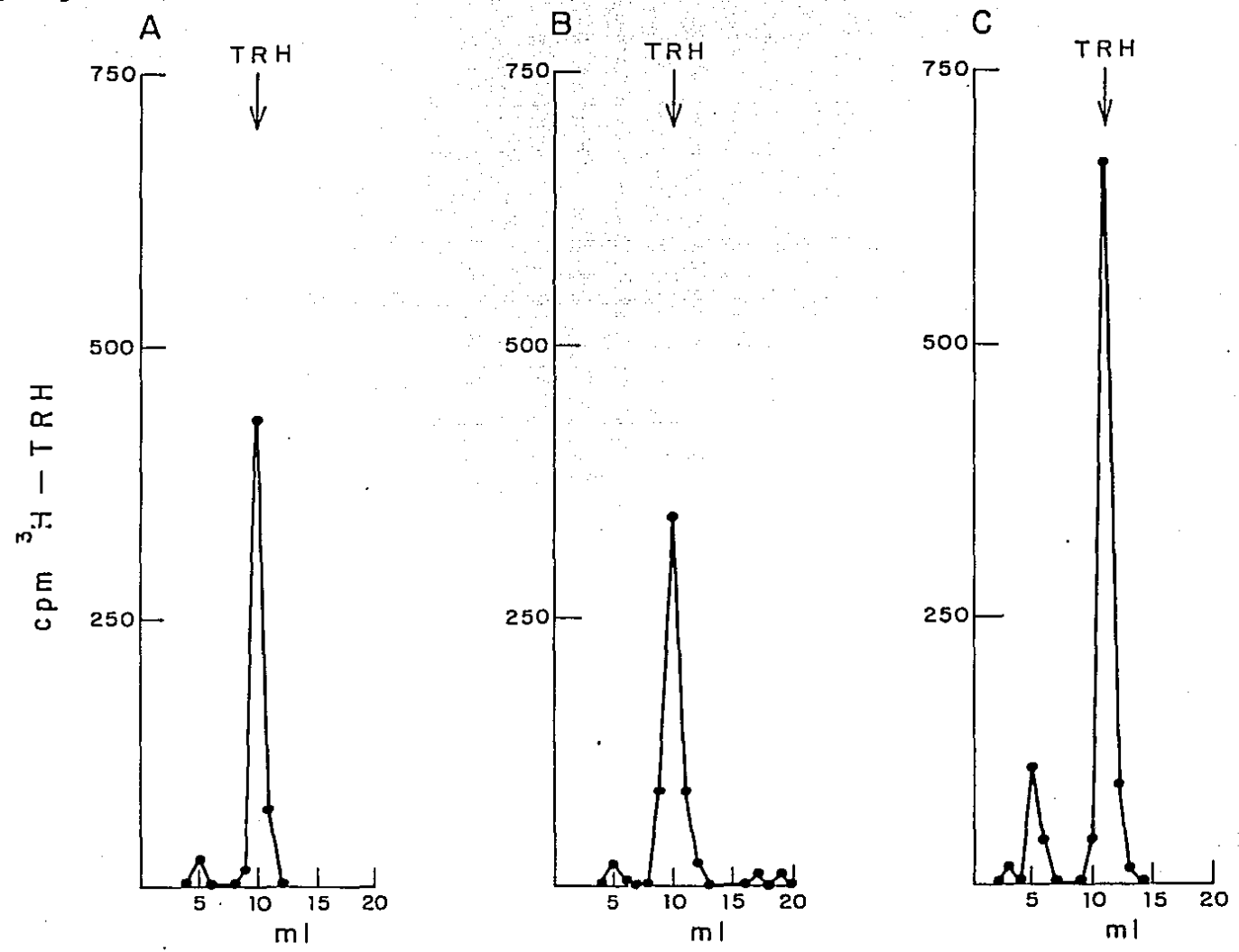
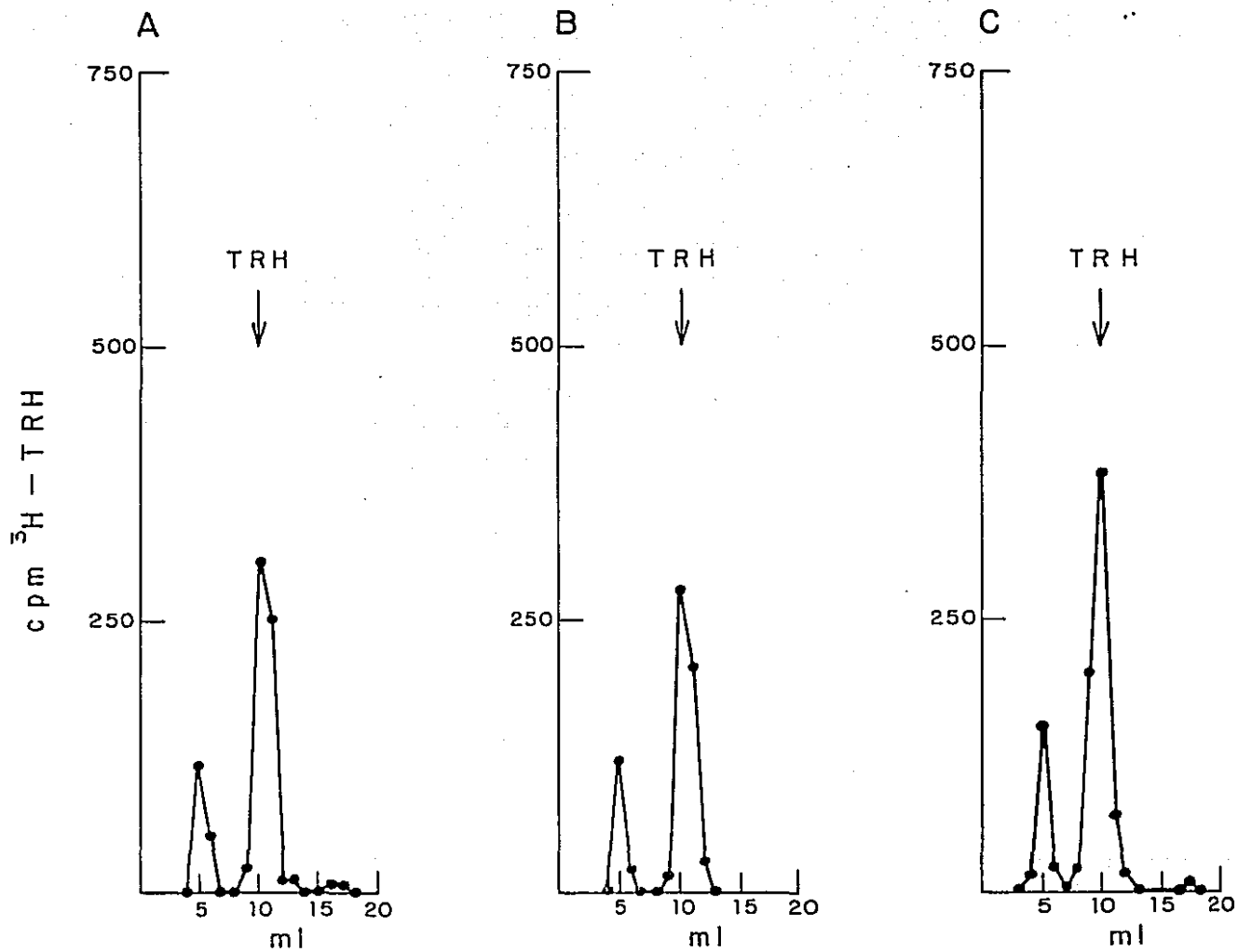


Fig. 35

TEJIDOS (60 min)



## DISCUSION.

La validación del estudio de liberación regional y de la caracterización química del material inmunoreactivo liberado de hipotálamo reside en gran parte en la calidad del anticuerpo anti-TRH utilizado. La especificidad del anticuerpo R<sub>2</sub> utilizado en este estudio se confirmó de varias formas : 1) el hecho de que el anticuerpo no cruce con metabolitos y con la mayoría de los análogos de TRH y con otros peptidos (Joseph-Bravo et al., 1979); 2) los niveles de TRH detectados en diferentes áreas del cerebro de rata concuerdan con los reportados por otros autores (Winokur y Utiger, 1974; Oliver et al., 1974; Schaeffer et al., 1977b; Jackson y Reichlin, 1979; Chen y Ramirez, 1981; Lechan et al., 1983; Harkness y Brownfield, 1985); 3) el comportamiento cromatográfico de TRH endógeno hipotalámico coincide con el de TRH sintético y estos resultados son similares a los reportados por otros autores (Kreider et al., 1979; Jackson, 1980; Spindel y Wurtman, 1980; Sheward et al., 1983); 4) el paralelismo entre los medios de incubación de rebanadas de hipotálamo y la curva estándar de TRH; 5) el hecho de que la mayor parte del material liberado de rebanadas de hipotálamo corresponda a TRH auténtico. Todos estos datos, en conjunto, confirman la especificidad de nuestro anticuerpo y validan, por lo tanto, su utilización en el estudio de liberación de TRH en diferentes regiones del cerebro de rata.

Rebanadas de hipotálamo incubadas en las condiciones descritas son capaces de liberar consistentemente TRH al medio de incubación en respuesta a una depolarización inducida por 56 mM KCl. El efecto es

dependiente de calcio externo, como se ha descrito anteriormente utilizando otros sistemas (Charli et al., 1978; Joseph-Bravo et al., 1979; Maeda y Frohman, 1980), y probablemente involucra el flujo de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltage, ya que la presencia de altas concentraciones de magnesio en el medio bloquea el efecto de calcio. La dependencia de calcio en la liberación basal de TRH, por otra parte, no es clara.

Resultados en nuestro laboratorio sobre la degradación de <sup>3</sup>H-pro-TRH en rebanadas de hipotálamo en el sistema de incubación descrito en este trabajo, han mostrado que cuando el tejido se preincuba por 20 min en KRE, la participación de las enzimas solubles (PGAs y PPGs) en la degradación del péptido liberado es mínima, lo que indica que la preincubación es eficiente para lavar las peptidasas solubles que se liberan del tejido por dano celular. En estas condiciones se produce fundamentalmente His-Pro-Dicetopiperazina (A. Báez, comunicación personal). Este metabolito puede ser producido in vitro tanto por la PGA<sub>s</sub> como por la PGAM; sin embargo, la PGA<sub>s</sub> sólo es activa en presencia de ditiotretitol (DTT) y EDTA, mientras que la PGAM es inhibida en presencia de estos compuestos y activa en su ausencia. En el sistema de incubación utilizado hemos verificado que el TRH es degradado esencialmente por la PGAM (Charli et al., manuscrito en preparación). Por otra parte, nuestros resultados sobre liberación de TRH (basal y 50 mM KCl) en presencia de bacitracina confirman que el sistema de incubación utilizado proporciona un lavado eficiente de las peptidasas solubles, ya que en presencia de este inhibidor los niveles de TRH liberados no son aumentados. Además, esto es congruente con el hecho de que la bacitracina no inhibe a la PGAM (Garat et al., 1985).

La confirmación de que la liberación de TRH estimulada por 56 mM KCl de rebanadas de hipotálamo es dependiente de calcio, valida nuestro sistema de incubación in vitro y por lo tanto, permite estudiar la liberación de TRH en otras áreas del cerebro de rata. Este sistema de incubación in vitro presenta algunas ventajas sobre otros sistemas. Por un lado, en comparación con las diferentes modalidades de incubaciones estáticas, la preincubación de 20 min remueve las peptidasas solubles liberadas de células dañadas y de esta forma se reduce la degradación del péptido liberado, además de que se alcanza un nivel basal estable, y la comparación entre la cantidad de TRH liberada durante la estimulación y durante el período de liberación basal permite hacer una estimación adecuada de la magnitud de la respuesta al estímulo aplicado. Por otro lado, este método presenta algunas de las ventajas del sistema de superfusión: cada grupo experimental es su propio control y el tejido está sujeto a un "stress" muy pequeño durante toda la incubación. Este método reduce las posibles pérdidas del péptido en el aparato de perfusión debidas a pegado y/o degradación, y permite manejar un gran número de muestras por experimento (usualmente trabajamos con 20 - 40 muestras en un período de 40 min).

Un hecho que llama la atención es la amplia variabilidad en la liberación basal de TRH en las diferentes regiones del cerebro de rata. Esta variabilidad puede explicarse de varias maneras: 1) artefacto introducido por masa variable incubada; 2) disociación variable de receptores; 3) distribución variable de la PGAm; 4) localización no homogénea de artefactos en el RIA; 5) existencia de diferentes pozas de TRH; 6) actividad intrínseca de las neuronas in vitro.



El artefacto introducido por masa variable incubada pudiera corresponder a la existencia de sustancias en el cerebro que se liberen homogéneamente y sean capaces de estimular la liberación basal de TRH, o bien, que exista un mecanismo homogéneo de inactivación del péptido en el que no este involucrada la PGAM. Puesto que no existe correlación entre los niveles de TRH liberados basalmente y la cantidad de masa incubada (Tabla 7), pensamos que este factor no influye en la variabilidad observada en la liberación basal.

Cuando analizamos la posibilidad de que la variabilidad en la liberación basal estuviera dada por diferencias en el número de receptores a TRH y por disociación del péptido de éstos, observamos que no existe una correlación entre el número de receptores a TRH en las distintas áreas estudiadas (Ogawa et al., 1982; Taylor y Burt, 1982) y el porcentaje de TRH liberado basalmente en relación al contenido total de péptido en el tejido después de la incubación. Aunque el número de receptores al péptido no parece estar relacionado con los niveles de TRH detectados en condiciones basales, en la adenohipófisis es probable que la cantidad tan alta de TRH detectada en los medios de incubación se deba a disociación de TRH de su receptor.

Por otra parte, resultados preliminares en nuestro laboratorio indican que la actividad de la PGAM es variable en las diferentes regiones del cerebro de rata (H. Vargas, resultados no publicados). Sin embargo, no pudimos observar una correlación entre la actividad de la PGAM (actividad total o actividad específica) y los niveles de TRH detectados en condiciones basales.

Existe también la posibilidad de que sustancias distribuidas no homogéneamente en el cerebro que crucen con el anticuerpo de TRH pudieran afectar los valores de TRH liberado. No creemos que éste sea el caso, ya que, como ha sido reportado por otros autores (Kreider et al., 1979, 1981; Jackson, 1980; Spindel y Wurtman, 1980; McDermott et al., 1981), la inmunoreactividad en las diferentes áreas del cerebro corresponde a TRH. Sin embargo, aunque en los medios de incubación de hipotálamo encontramos un pico inmunoreactivo principal que corresponde a TRH, en este caso pudimos detectar la presencia de dos moléculas adicionales que parecen ser muy semejantes a TRH. Por lo tanto, estos resultados indican que es necesario un estudio más profundo sobre la naturaleza de la(s) molécula(s) liberada(s) de otras áreas del cerebro, lo cual podría hacerse mediante el análisis cromatográfico de la inmunoreactividad liberada.

La amplia variabilidad observada en liberación basal podría explicarse proponiendo la existencia de diferentes pozas de TRH intraterminales. La existencia de tales pozas ha sido inferida a partir de estudios utilizando sinaptosomas de hipotálamo de rata en los que una fracción de vesículas TRH-érgicas intra-sinápticas es resistente a choque hip-osmótico (Barnea et al., 1978), y a partir de estudios en que sólo una parte de TRH se escapa de sinaptosomas de hipotálamo y de corteza de rata cuando éstos se transfieren de 0.32 M sacarosa a un medio salino (Warberg, 1982). Estos datos y los nuestros apoyan la posibilidad de que existan diferencias en la disponibilidad de TRH en la neurona (una poza de TRH más lábil que otra, es decir, una poza más fácilmente liberable que otra), y sugieren que ésta pudiera ser variable dependiendo de la región cerebral.

En el caso de otros péptidos también se ha sugerido la presencia de varias pozas (White et al., 1985). Estudios sobre liberación de vasopresina de neurohipófisis han mostrado que sólo una porción de la poza total de péptido almacenado puede ser liberado, es decir, que en este tejido existe una poza fácilmente liberable de vasopresina. La liberación de este péptido se atenúa después de una estimulación prolongada, ya sea eléctrica o por 56 mM KCl. En este caso, la liberación inicial de péptido es de 10 - 20 %. Estudios de liberación in vitro de vasopresina marcada in vivo con <sup>35</sup>S -cisteína, sugieren que las moléculas de la poza fácilmente liberable son también las moléculas recién sintetizadas y son las que se liberan preferencialmente. Además, la actividad específica de la vasopresina liberada es sustancialmente mayor que la de la vasopresina que queda en el tejido. En el caso de somatostatina, varios estudios han mostrado que del total almacenado en el hipotálamo cuando mucho se libera el 5 %, mientras que la liberación de somatostatina de neuronas sensoriales no excede el 7%. La liberación de este péptido de eminencia media y de neurohipófisis no excede el 0.5 y el 7.8% del contenido total en el tejido, respectivamente. Estas evidencias sugieren que probablemente una gran parte de la somatostatina almacenada está en forma no fácilmente liberable y que quizás las características de la poza de almacenamiento son diferentes en áreas distintas.

Así, la existencia de diferentes pozas liberables de péptidos parece estar bien fundamentada. Sin embargo, el mecanismo por el cual se establecen estas pozas y como son reguladas no son claros.

Otra posible explicación de la variabilidad observada en la

liberación basal pudiera ser el hecho de que la actividad neuronal in vitro, ya sea intrínseca o evocada por ciertos neurotransmisores estimuladores o inhibidores, difiera en estas áreas.

Otro punto a considerar es el hecho de que los axones de las neuronas TRH-érgicas no están distribuidos homogéneamente en estas áreas, como lo sugieren los análisis de inmunohistoquímica (Palkovits, 1984). Los niveles de TRH detectados basalmente podrían estar influenciados por la mayor proporción de axones en determinadas regiones. En estos axones el "escape" de TRH a través de membranas, o bien el transporte activo de vesículas TRH-érgicas hacia los extremos axónicos cortados, pudieran influir sobre los niveles de TRH detectados en el medio, haciendo que la liberación basal aparezca como aumentada cuando hay una proporción mayor de axones.

Otra alternativa es que fisiológicamente exista liberación axonal de TRH, como se ha sugerido para algunos neurotransmisores (Vizi et al., 1983).

Por lo tanto, consideramos que de las posibilidades señaladas anteriormente, la existencia de diferentes pozas de péptido, la actividad neuronal intrínseca in vitro en cada área, la proporción diferencial de axones en cada región y la probable existencia de liberación axonal de TRH, pudieran explicar la gran variabilidad observada en liberación basal de TRH en regiones del cerebro de rata. Es claro, por consiguiente, que se requiere de estudios adicionales dirigidos a determinar si uno o varios de estos factores están directamente involucrados en los mecanismos celulares de compartimentalización y liberación de neuropéptidos en el cerebro. Una de las estrategias pudiera consistir, por un lado, en estudiar el

efecto de tetradoxina (para bloquear la actividad intrínseca) sobre la liberación basal de TRH en diferentes áreas, así como de neurotransmisores que modulen la liberación de este péptido. Por otra parte, el uso de sinaptosomas de diferentes áreas cerebrales y en condiciones experimentales diversas, podría contribuir al conocimiento de las formas de almacenamiento y disponibilidad del péptido en la terminal nerviosa y de la capacidad de liberarlo al medio en respuesta a determinados estímulos. Además, el uso de inhibidores específicos de las enzimas que degradan TRH en diferentes regiones, contribuiría al conocimiento del papel que desempeñan estas enzimas en la regulación de los niveles de TRH, tanto dentro de la terminal nerviosa como en el espacio sináptico una vez que el péptido ha sido liberado.

Cabe señalar que en regiones como la neurohipófisis, la amígdala, el mesencéfalo, la médula oblongada, la corteza cerebral frontal (olfatoria), la adenohipófisis y la vermis cerebelar, el porcentaje de TRH liberado en condiciones basales en relación al contenido total de péptido en el tejido después de incubar fue menor que el calculado en relación al contenido en el tejido sin incubar, es decir, los niveles de TRH detectados en los tejidos después de la incubación fueron superiores a los detectados en los tejidos sin incubar. Estos resultados sugieren la posibilidad de que durante la incubación se sintetice TRH en estas áreas, es decir, que se lleve a cabo un procesamiento del precursor de TRH, o bien, que en estas regiones en particular, existan otras sustancias que crucen con el anticuerpo de TRH.

Resultados similares se obtienen cuando rebanadas de médula espinal (región cervical) se someten a una incubación prolongada. En

este caso, los niveles de TRH detectados en el tejido después de la incubación son superiores a la diferencia entre el contenido inicial (sin incubar) y la cantidad de TRH liberada durante toda la incubación. Estos resultados sugieren la posibilidad de que durante la incubación de rebanadas de médula espinal (cervical) se lleve a cabo un procesamiento del precursor de TRH, de manera que la cuantificación de niveles superiores del péptido en el tejido al final de la incubación pudiera corresponder a TRH recién procesado o a intermediarios del procesamiento. Alternativamente, es posible que existan moléculas diferentes a TRH pero que crucen con el anticuerpo.

En cuanto a la liberación de TRH estimulada por 56 mM KCl, este estudio muestra que existe un patrón diferencial en la liberación de TRH en el cerebro de rata. Un análisis global de las regiones estudiadas revela que no existe correlación entre el contenido total o la concentración de TRH en el tejido y la habilidad para liberar el péptido al medio en respuesta a una depolarización. Además, no todas las regiones que contienen TRH son capaces de responder a la depolarización. De un total de 20 regiones estudiadas, sólo 8 respondieron significativamente a la estimulación. De éstas, la eminencia media, el área preóptica, el hipotálamo y el núcleo accumbens son las áreas en que el TRH se encuentra en mayor concentración y en las que la magnitud de la respuesta a la depolarización fue mayor. Estas áreas son también las que mostraron el menor porcentaje de TRH liberable en condición basal en relación al contenido total de péptido en el tejido. Por otra parte, en la amígdala, el mesencéfalo, la médula oblongada y la médula espinal (cervical), regiones con concentraciones intermedias de TRH, la magnitud de la respuesta a la depolarización fue menor que en las

áreas antes mencionadas, y el porcentaje de TRH liberable basalmente en relación al contenido total de péptido en el tejido fue considerablemente mayor. Sin embargo, no existe correlación entre el contenido de TRH en estas áreas y la magnitud de la respuesta a 56 mM KCl. Parece existir una relación inversa entre el efecto del depolarizante y el porcentaje de TRH liberable basalmente en relación al contenido total en el tejido. Cuando la liberación basal excede un 14 % del contenido total, no se observa efecto del depolarizante.

El hecho de que el resto de las regiones estudiadas no haya respondido a la depolarización puede deberse a que el efecto de 56 mM KCl esté oscurecido por una basal alta y/o a la existencia de una poza no fácilmente liberable en mayor proporción que una poza fácilmente liberable. Con respecto a la posibilidad de que el efecto estuviera oscurecido por una basal alta debida a que el tejido no se ha estabilizado en el sistema en el momento de la estimulación, la cinética de liberación de TRH de médula espinal (cervical) muestra que aun cuando el tejido se estabilice por 60 min la liberación basal del péptido se mantiene constante desde los 30 min en adelante. Aún más, el efecto de 56 mM KCl obtenido al estimular después de 30, 50 ó 70 min de incubación es similar, por lo que al menos en este tejido, el efecto del depolarizante es significativo aún cuando la liberación basal sea alta. Sin embargo, en otras regiones del cerebro pudiera no ocurrir lo mismo, por lo que se requiere de un estudio cinético de liberación de TRH en estas áreas.

Los resultados de liberación basal en médula espinal sugieren que probablemente en esta región existe una poza funcional de TRH fácilmente liberable que pudiera estar en mayor proporción que una

poza no fácilmente liberable. Por otra parte, el hecho de que exista una aparente correlación entre los porcentajes de liberación basal y los porcentajes de liberación estimulada (sobre la basal) en el caso de las regiones que responden significativamente a la depolarización, sugiere también la probable existencia de diferentes formas de almacenamiento del péptido, ésto es, la existencia de una poza fácilmente liberable y de otra no fácilmente liberable en determinadas áreas cerebrales. En la amígdala, el mesencéfalo, la médula oblongada y la médula espinal (cervical), el porcentaje de liberación basal y el porcentaje de liberación estimulada (sobre la basal) es alto en los dos casos, lo que sugiere que en estas áreas pudiera existir una poza de péptido fácilmente liberable. En contraste, en la eminencia media, el área preóptica, el hipotálamo y el núcleo accumbens, los porcentajes de liberación basal y estimulada son bajos, lo que sugiere que en estas áreas quizás existe una poza no fácilmente liberable en mayor proporción que una fácilmente liberable. La posibilidad de que existan tales pozas excluiría, por lo tanto, el factor de "escape" de TRH a través de membranas y transporte activo de vesículas TRH-érgicas en axones cortados, que se había considerado anteriormente para explicar la gran variabilidad en liberación basal.

Las regiones que liberaron significativamente TRH al medio en respuesta a la depolarización son áreas en donde se ha reportado la presencia de un gran número de receptores a TRH (Ogawa et al., 1982; Taylor y Burt, 1982) y en donde existe una alta densidad de terminales TRH-érgicas (Palkovits, 1984). Estas regiones representan también aquellas áreas en que se han reportado efectos específicos de TRH (Nicoll, 1977; Kerwin y Pycocok, 1979; Yarbrough y Singh, 1979; Heal et al., 1983; Kalivas y Horita, 1983; Bennett et al., 1983; Sharp et al.,



1982, 1984; Miyamoto et al., 1984). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de TRH como posible neurotransmisor o neuromodulador, al menos en estas áreas del cerebro de rata.

Con respecto a la caracterización cromatográfica (HPLC) del TRH inmunoreactivo en hipotálamo de rata, nuestros resultados muestran que la mayor parte (aproximadamente el 90 %) corresponde a TRH auténtico, lo cual está de acuerdo con los reportes de otros autores (Kreider et al., 1979; Jackson, 1980; Spindel y Wurtman, 1980; Sheward et al., 1983) utilizando diversos sistemas cromatográficos. Por otra parte, el análisis cromatográfico de los medios de incubación revela que una buena parte del material liberado, tanto en condición basal como estimulada por 56 mM KCl, es TRH auténtico. Sin embargo, en los medios aparecen dos moléculas adicionales que son inmunológicamente semejantes a TRH. La presencia de otras moléculas TRH-inmunoreactivas en fluidos corporales ya ha sido reportada, lo cual apoya nuestros resultados. Biggins et al. (1983), analizando muestras de líquido cefalorraquídeo lumbar de humano por HPLC encontraron 4 sustancias inmunoreactivas, la primera de las cuales corresponde a TRH auténtico. Estas observaciones se repiten a bajas y a altas concentraciones de TRH. Por otra parte, Youngblood et al. (1978), usando filtración en gel, TLC y cromatografía de afinidad, llegaron a la conclusión de que la inmunoreactividad presente en orina y suero humanos y en suero de rata no es TRH, y que en estas muestras se presentan muchos picos inmunoreactivos. Asimismo, la caracterización química de las sustancias TRH-inmunoreactivas en orina han conducido a que este grupo especule sobre dos probables estructuras : 1) p-Glu-His-----, y 2) p-Glu-His-Gly-Gly----. Además, Pekary y Friedman (1983), analizando muestras de semen humano fresco por HPLC y RIA, detectaron

la presencia de dos picos inmunoreactivos que corresponden a TRH auténtico y a un péptido con secuencia tentativa p-Glu-X-Pro-NH<sub>2</sub> (donde X = aminoácido neutro) y, por otro lado, Sheward et al. (1983) encontraron que el TRH inmunoreactivo de extractos etanólicos de sangre portal de rata produce 3 picos inmunoreactivos por HPLC en condiciones muy semejantes a las usadas por nosotros. El primero de los picos corresponde a TRH auténtico. Estos autores reportan además que los dos picos adicionales en sangre portal son más hidrofóbicos que TRH y que no corresponden a metabolitos de TRH, ya que ni TRH-OH ni His-Pro-Dicetopiperazina cruzan significativamente con su anticuerpo de TRH. Estos resultados concuerdan con los nuestros y apoyan el hecho de que en los medios de incubación de rebanadas de hipotálamo aparezcan moléculas adicionales a TRH.

La heterogeneidad del material detectado en fluidos no parece restringirse a TRH, ya que en sangre portal se ha demostrado, por filtración en gel, la presencia de dos formas somatostatina-inmunoreactivas, mientras que un análisis por intercambio catiónico revela la presencia de 4 picos inmunoreactivos. Además, cuando se implanta una cánula "push-pull" en eminencia media de rata y se analizan los niveles de somatostatina liberados en animales en movimiento, se encuentran 4 formas inmunoreactivas que aparentemente son similares a las de los extractos de eminencia media (White et al., 1985).

Se ha sugerido que los péptidos liberados al espacio sináptico pueden ser inactivados no sólo por proteasas extracelulares sino también por la membrana plasmática de la célula postsináptica. Además de la hidrólisis de enlaces peptídicos, los péptidos pueden sufrir una

modificación covalente, como N-acetilación, metilación, oxidación, hidroxilación, etc (White et al., 1985). Se ha sugerido que la N-acetilación está ligada a la liberación de la Hormona Estimulante de Melanocitos ( $\alpha$ -MSH) de la pars intermedia de pituitaria de rana (Martens et al., 1981), ya que este péptido está restringido exclusivamente al medio de incubación, mientras que el precursor inmediato (forma des-acetilada) predomina en el tejido y nunca se encuentra en el medio. Se sugiere además, que la forma des-acetilada podría constituir una forma de almacenamiento de  $\alpha$ -MSH, y que la acetilación ocurre justo antes o durante la liberación del péptido.

En el caso de TRH, algunos grupos de investigadores han sugerido que la molécula de TRH podría ser modificada y mantener su inmunoreactividad. Morley et al. (1980) han reportado la existencia de una sustancia natural inmunoreactiva en tumores de adenohipófisis, en testículo de rata y en alfalfa con actividad de PIF (Factor Inhibidor de la secreción de Prolactina), muy semejante a TRH en peso molecular, que no se presenta en el hipotálamo. Estos autores sugieren que si esta sustancia puede detectarse en pituitarias normales, su presencia podría ser el resultado de una modificación de la molécula de TRH que ocurre después de su síntesis en el hipotálamo. Por otro lado, Pekary y Friedman (1983) han mostrado que cuando una muestra de semen humano fresco es incubada a 4 °C, al inicio más del 80 % de la inmunoreactividad corresponde a TRH auténtico, mientras que durante la primera hora de incubación más del 80 % se ha convertido a un péptido con secuencia tentativa p-Glu-X-Pro-NH<sub>2</sub> (X = aminoácido neutro). Estos autores concluyen que el semen humano fresco produce a partir de TRH un péptido homólogo por un mecanismo libre de células que es independiente de la síntesis de novo de proteínas, ya que el

proceso de conversión no es afectado por cicloheximida y no se observa en esperma lavado.

En el presente estudio, no se pudo observar una modificación de 3 H-pro-TRH por rebanadas de hipotálamo a ninguna de las concentraciones probadas ni prolongando el tiempo de incubación, por lo que aparentemente no ocurre una modificación extracelular del TRH liberado. Sin embargo, esta hipótesis no puede descartarse aún debido a que la Km del fenómeno pudiera ser mayor (en este estudio se llegó hasta 1  $\mu$ M) y debido al desconocimiento de las concentraciones de TRH en las sinapsis. Por lo tanto, se requiere de experimentos adicionales en los que se cubra un rango más amplio de concentración de TRH para poder sacar conclusiones al respecto.

Por lo tanto, son factibles las otras dos alternativas. Nuestros resultados indican que no existen moléculas inmunoreactivas de alto peso molecular ni en los extractos hipotalámicos ni en los medios de incubación. Estos datos concuerdan con los reportados por otros autores. Sin embargo, si se liberan moléculas con la secuencia de TRH extendidas en su extremo COOH terminal que sean intermediarios del procesamiento del precursor de TRH, muy probablemente el peso molecular es muy cercano al de TRH y por lo tanto, no se podrían distinguir en una filtración en gel en Sephadex G-25-40. Por otra parte, los resultados de la caracterización del anticuerpo anti-TRH usado indican que una molécula tipo TRH extendida en su extremo COOH terminal es reconocida por éste, y aunque en este caso el tiempo de retención del análogo no coincide con el de los picos inmunoreactivos adicionales a TRH que aparecen en los medios de incubación, queda la posibilidad de que ciertos intermediarios del procesamiento se liberen

Junto con TRH. Alternativamente, es posible que existan moléculas diferentes a TRH pero que crucen con el anticuerpo y que se liberen junto con TRH.

En conclusión, gran parte del material liberado de rebanadas de hipotálamo es TRH auténtico. En los medios de incubación se detectan dos moléculas adicionales inmunoreactivas, más hidrofóbicas que TRH, que pudieran corresponder a intermediarios del procesamiento del precursor de TRH o a moléculas de TRH modificadas, o a sustancias diferentes de TRH. En los medios de incubación no se detectan moléculas inmunoreactivas de alto peso molecular.

El conocimiento de la naturaleza química de estas moléculas inmunoreactivas resulta de gran interés, ya que su presencia en el material inmunoreactivo liberado de hipotálamo cuestiona acerca de si estas moléculas pudieran desempeñar alguna función fisiológica en el eje hipotalámico-hipofisario. Por lo tanto, se requiere de un estudio exhaustivo haciendo uso de anticuerpos específicos contra moléculas tipo TRH extendidas en su extremo COOH terminal, la susceptibilidad de estas moléculas al ataque por diversas peptidasas, el estudio del efecto que estas moléculas tienen sobre la adenohipófisis (liberación de TSH y prolactina), el análisis de la inmunoreactividad liberada de otras regiones del cerebro y su comparación con la observada en el hipotálamo, e idealmente, la obtención de grandes cantidades de estas moléculas para su secuenciación.

REFERENCIAS.

- Abraham F., Pisano J.J. and Eidenfriend S. (1954) Uptake of carnosine and homocarnosine by rat brain slices. Arch. Biochem. Biophys. 104 : 160.
- Artilla S. and Langer S. Z. (1978) Morphine and  $\beta$ -endorphin inhibit release of noradrenaline from cerebral cortex but not of dopamine from rat striatum. Nature 271 : 559-560.
- Baird J.G., Dobson P. R. H., Wojcikiewicz R. J. H. and Brown B. L. (1983) Thyrotropin-Releasing Hormone Stimulates Inositol Phosphate Production in Normal Anterior Pituitary Cells and GH<sub>3</sub> Tumour Cells in the Presence of Lithium. Bioscience Reports 3 : 1091-1099.
- Barnes A., Ben-Jonathan N. and Porter J. C. (1976) Characterization of Hypothalamic Subcellular Particles Containing Luteinizing Hormone Releasing Hormone and Thyrotropin Releasing Hormone. J. Neurochem. 27 : 477-484.
- Barnes A., Heaves U. B., Cho G. and Porter J. C. (1978) A Subcellular Pool of Hypo-osmotically Resistant Particles Containing Thyrotropin Releasing Hormone,  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Releasing Hormone in the Rat Hypothalamus. J. Neurochem. 30 : 937-948.
- Bassiri R. M. and Utiger R. D. (1974) Thyrotropin Releasing Hormone in the Hypothalamus of the Rat. Endocrinology 94 : 188-197.
- Bauer K. (1976) Regulation of degradation of Thyrotropin releasing hormone by the thyroid hormones. Nature 259 : 591-593.
- Bauer K. (1983) Biochemical Properties of TRH-Inactivating Enzymes. In : Thyrotropin-Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 103-107.
- Bennett G. W., Edwardson J. A., Holland D., Jeffcoate S. L. and White N. (1975) Release of immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone from hypothalamic synaptosomes. Nature 257 : 323-325.
- Bennett G. W., Sharp T., Brazell H. and Marsden C. A. (1983) TRH and Catecholamine Neurotransmitter Release in the Central Nervous System. In : Thyrotropin-Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 253-269.
- Riggins J. A., Das S., Dodd P. R., Edwardson J. A., Hardy J. A., McDermott J. R. and Smith A. I. (1983) Studies on the Release, Degradation and Presynaptic Actions of Thyrotropin-Releasing Hormone. In : Thyrotropin-Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, pp. 241-250.
- Roler J., Enzmann F., Folke K., Bowers C. Y. and Schally A. V. (1969) The Identity of Chemical and Hormonal Properties of TRH and Pyroglutamyl-histidyl-prolineamide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 : 705-710.

Reichlin, D. J., Desvergne, B., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1973) An isolation of the hypothalamic peptide, **Tamyl** (Tammelin), a non-protein amino acid and a polypeptide, **Protilidyl** (Protilidyl), which has been shown to be identical with the hypothalamic releasing factor, **Pig** (Pig). *Brain Res.* 67: 1-10. **137**

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1974) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

Reichlin, D. J., and Guillemin, R. (1975) Neuroendocrine releasing factors: A multiple activity in pituitary. *Brain Res.* 97: 201-211.

- Secretion. In : Thyrotrocin-Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, Ney York, pp. 127-143.
- Fischman A. J., Kastin A. J. and Graf H. V. (1984) HPLC Shadowing : Artifacts in Peptide Characterization Monitored by RIA. *Peptides* 5 : 1007-1010.
- Fleischer N., Lorente H., Kirkland D. J., Kirkland R., Clayton G. and Calderon H. (1972) Synthetic thyrotropin releasing factor as a test of pituitary thyrotropin reserve. *J. Clin. Endocrinol.* 34 : 617.
- Fraser H. H. and McNeilly A. S. (1982) Effect of Chronic Immunoneutralization of Thyrotropin-Releasing Hormone on the Hypothalamic Pituitary-Thyroid Axis, Prolactin and Reproductive Function in the Ewe. *Endocrinology* 111 : 1964-1973.
- Garal B., Miranda J., Charl J. L. and Joseph-Bravo P. (1985) Presence of a Membrane Bound Pyroglutanyl Aminopeptidase Degrading Thyrotropin Releasing Hormone in Rat Brain. *Neuropeptides* 6 : 27-40.
- Geras E., Rebecchi H. J. and Gershengorn H. C. (1982) Evidence that Stimulation of Thyrotropin and Prolactin Secretion by Thyrotropin-Releasing Hormone Occur Via Different Calcium-Mediated Mechanisms : Studies with Verapamil. *Endocrinology* 110 (3), 901-906.
- Grant G., Ling N., Rivier J. and Vale W. (1973) Orientation restrictions of the peptide hormone thyrotropin releasing factor due to intramolecular hydrogen binding. *Biochemistry* 11 : 307.
- Green A. R. and Grahame-Smith D. G. (1974) TRH potentiates behavioral changes following increased brain 5-hydroxytryptamine accumulation in rats. *Nature* 251 : 524-526.
- Greenwood F. C., Hunter W. M. and Glover J. S. (1963) The preparation of <sup>125</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89 : 114-123.
- Grosvenor C. E. and Mena F. (1980) Evidence that Thyrotropin-Releasing Hormone and Hypothalamic Prolactin Releasing Hormone Factor may Function in the Releasing of Prolactin in the Lactating Rat. *Endocrinology* 107 : 863-868.
- Harkness D. H. and Brownfield H. S. (1985) Intra and Intersegmental Distribution of Thyrotrocin-Releasing Hormone (TRH) in Rat Spinal Cord : Topographical Variation and Presence in the Dorsal Horn. Society for Neuroscience, 15 th Annual Meeting, Dallas, Texas, October 20-25, p.349.
- Heal D. J. and Green A. R. (1979) Administration of thyrotropin-releasing hormone (TRH) to rats releases dopamine in n. accumbens but not in n. caudatus. *Neuropharmacology* 18 : 23-31.
- Heal D. J., Sabbagh A., Youdim H. B. and Green A. R. (1981) Behavioral effects of central and peripheral injection of various analogues and metabolites of thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Neuropharmacology* 20 : 947-957.
- Heal D. J., Pycock C. J., Youdim H. B. H. and Green A. R. (1983) Actions of



- TRH and Its Analogues on the Mesolimbic Dopamine System. In : Thyrotropin-Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 271-282.
- Hinkle P. H., Perrone H. H. and Schonbrunn A. (1981) Mechanism of Thyroid Hormone Inhibition of Thyrotropin Releasing Hormone Action. *Endocrinology* 108 (1) : 199.
- Hirooka Y., Hollander C. S., Suzuki S., Ferdinand P. and Juan S. I. (1978) Somatostatin inhibits release of thyrotropin releasing factor from organ cultures of rat hypothalamus. *PNAS* 75 : 4509-4514.
- Hökfelt T., Elde R., Fuxe K., Johansson O., Ljungdahl A., Goldstein H., Luft R., Efendic S., Nilsson G., Terenius L., Gauten D., Jeffcoate S. L., Rechfeld J., Sald S., Perez de la Hora M., Possani L., Tapia R., Teran L. and Palacios R. (1978) Aminergic and Peptidergic Pathways in the Nervous System with special reference to the hypothalamus. In : *The Hypothalamus* (S. Reichlin, R. J. Baldessarini and J. B. Martin, eds.), Raven Press, New York, pp. 69-135.
- Holaday J. W. (1984) Neuropeptides in shock and traumatic injury : sites and mechanisms of action. In : *Neuroendocrine Perspectives* (E. E. Müller and R. H. MacLeod, eds.), Vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 161-199.
- Horst W. D., Spirt H. and Bantz G. (1979) Influence of Thyrotropin-Releasing Hormone on the Synaptic Availability of Catecholamines in Brain. In : *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and Other Peptides* (R. Collu et al., eds.), Raven Press, New York, pp. 141-143.
- Jackson I. H. D. (1980) TRH in the Rat Nervous System : Identity with synthetic TRH on high performance liquid chromatography following affinity chromatography. *Brain Res.* 201 : 245-248.
- Jackson I. H. D. (1983) Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) : Distribution in Mammalian Species and its Functional Significance. In : *Thyrotropin-Releasing Hormone* (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 3-18.
- Jackson I. H. D. and Lechan R. H. (1983) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH). In : *Brain Peptides* (D. T. Krieger, H. J. Brownstein and J. B. Martin, eds.), John Wiley and Sons, New York, pp. 661-685.
- Jackson I. H. D. and Reichlin S. (1974) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) : Distribution in hypothalamic and extrahypothalamic brain tissues of mammalian and submammalian chordates. *Endocrinology* 95 : 854-862.
- Jackson I. H. D. and Reichlin S. (1979) Distribution and Biosynthesis of TRH in the Nervous System. In : *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and Other Peptides* (R. Collu et al., eds.), Raven Press, New York, pp. 3-54.
- Jeffcoate S. L. and White H. (1975) Is there any thyrotropin releasing hormone in mammalian extra-hypothalamic brain tissue ? *Proceedings of the Society for Endocrinology* 42P-43P.

- Johansson O., Hökfelt T., Jeffcoate S. L., White N. and Spindel E. (1983) Light and electron microscopic immunohistochemical studies on TRH in the Central Nervous System of the Rat. In : Thyrotropin-Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 19-32.
- Johansson O., Hökfelt T., Pernow B., Jeffcoate S. L., White N., Steinbusch H. W. H., Verhofstad A. A. J., Emson P. C. and Spindel E. (1981) Immunohistochemical support for three putative transmitters in the neuron : Coexistence of 5-hydroxytryptamine, Substance P- and Thyrotropin releasing hormone - like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord. *Neuroscience* 6 : 1857-1881.
- Joseph-Bravo P., Charli J. L., Palacios J. K. and Kordon C. (1979) Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104 : 801-806.
- Kalivas P. U. and Horita A. (1980) Thyrotropin-releasing hormone : Neurogenesis of actions in the pentobarbital narcotized rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212 : 203-210.
- Kalivas P. U. and Horita A. (1980) Involvement of the Septohippocampal System in the TRH Antagonism of Pentobarbital Narcosis. In : Thyrotropin-Releasing Hormone (E. C. Griffiths and G. W. Bennett, eds.), Raven Press, New York, pp. 283-290.
- Kardon F. C., Winokur A. and Utiger R. D. (1977) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) in the Rat Spinal Cord. *Brain Res.* 122 : 578-581.
- Kerwin R. W. and Pycocock C. J. (1979) Thyrotropin releasing hormone stimulates release of H-dopamine from slices of rat nucleus accumbens in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 67 : 323-325.
- Kizer J. S., Palkovits H., Tappaz M., Keabian J. and Brownstein H. J. (1976) Distribution of releasing factors, biogenic amines and related enzymes in the bovine median eminence. *Endocrinology* 98 : 685.
- König J. F. R. and Klippel R. A. (1967) The Rat Brain. A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. R. E. Krieger Publishing Co. Inc. The Williams and Wilkins Co., New York.
- Kreider H. S., Knight P., Winokur A. and Kizer N. R. (1982) TRH concentration in rat olfactory bulb is undiminished by deafferentation. *Brain Res.* 241 : 351-354.
- Kreider H. S., Winokur A. and Utiger R. D. (1979) TRH immunoreactivity in rat hypothalamus and brain : assesment by gel filtration and thin-layer chromatography. *Brain Res.* 171 : 161-165.
- Kreider H. S., Winokur A. and Krieger N. R. (1981) The olfactory bulb is rich in TRH immunoreactivity. *Brain Res.* 217 : 69-77.
- Kubek H. J., Lorincz H. A. and Wilber J. F. (1977) The identification of thyrotropin releasing hormone (TRH) in hypothalamic and extrahypothalamic loci of the human nervous system. *Brain Res.* 126 : 196-200.

- Labrie B., Barden H., Poirier G. and De Lean A. (1972) Binding of Thyrotropin Releasing Hormone to Plasma Membranes of Bovine Anterior Pituitary Gland. *PNAS* 69 (1) : 283-287.
- Lechan R. H. and Jackson I. H. D. (1982) Immunohistochemical localization of Thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 111 : 55-c5.
- Lechan R. H., Snapper S. B. and Jackson I. H. D. (1983) Evidence that Spinal Cord Thyrotropin-Releasing Hormone is Independent of the Paraventricular Nucleus. *Neuroscience Letters* 43 : 61-65.
- Lechan R. H., Wu P., Forte S. and Jackson I. H. D. (1985) Immunolocalization of the TRH Prohormone in the Rat Central Nervous System. Society for Neuroscience, 15th Annual Meeting, Dallas, Texas, October 20 - 25, p. 144.
- Lechan R. H., Wu P., Jackson I. H. D., Wolf H., Cooperman S., Mandel G. and Goodman R. H. (1986) Thyrotropin-Releasing Hormone Precursor : Characterization in Rat Brain. *Science* 231 : 159-161.
- Lowry O.H., Rosenbrough J. E., Farr A. L. and Randall R. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Maeda K. and Frohman L. A. (1980) Release of Somatostatin and Thyrotropin Releasing Hormone from Fat Hypothalamic Fragments in Vitro. *Endocrinology* 106 : 1837-1841.
- Hartens G. J. M., Jenks B. E. and Van Overbeeke A. P. (1981) N $\alpha$ - acetylation is linked to  $\alpha$ -MSH release from pars intermedia of the amphibian pituitary gland. *Nature* 294 : 558-560.
- Martino E., Seo H., Refetoff S., Simonetti S., Pinchera A. and Baschieri L. (1979) Ontogenesis of rat retinal thyrotropin releasing hormone (TRH) and effect of light exposure. *Acta Endocrinol. (Kbh), Suppl.* 225 : 230.
- Hatsui T., Prasad C. and Peterkofsky A. (1979) Metabolism of thyrotropin releasing hormone in brain extracts. Isolation and characterization of an imido peptidase for histidylprolineamide. *J. Biol. Chem.* 254 (7) : 2439-2445.
- McKelvy J. F. (1977) Biosynthesis of Hypothalamic Peptides. In : *Hypothalamic Peptide Hormones and Pituitary Regulation* (J. D. Porter, ed.), Plenum Press, New York, pp. 77-98.
- McDermott J. R., Smith A. I., Biggins J. A., Al-Noaemi M. C. and Edwardson J. H. (1981) Characterization of Neuropeptides by High-Performance Liquid Chromatography and Radioimmunoassay. *J. Chromatogr.* 222 : 371-379.
- Hiyamoto H., Narumi S., Nagai Y., Saji Y., and Nagawa Y. (1984) A TRH Analog (DN-1417) : Motor Stimulation with Rearing Related to Catecholaminergic Mechanisms in Rats. *Neuropharmacology* 23 : 61-72.
- Hiyamoto H., Narumi S., Nagai Y., Shima T. and Nagawa Y. (1979) Thyrotropin Releasing Hormone : Hyperactivity and Mesolimbic Dopamine System in rats.

- Jap. J. Pharmacol. 29 : 335.
- Hurley J. E., Meyer H., Pekary A. E., Helmed S., Carlsson H. E., Briggs J. E. and Hershman J. H. (1980) A Prolactin Inhibitory Factor with immun characteristics similar to Thyrotropin Releasing Factor (TRH) is present in rat pituitary tumors (GH<sub>3</sub> and W<sub>5</sub>), testicular tissue and a plant material, alfalfa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96 (1) : 47-53.
- Nicoll R. A. (1977) Excitatory action of TRH on spinal motoneurons. Nature 265 : 242-243.
- O'Connor B. and O'Quinn G. (1984) Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. Eur. J. Biochem. 144 : 271-278.
- Ogawa H., Yamawaki Y., Kuroda H., Nukina I., Ota Z., Fujino H. and Yanaihara N. (1982) Characteristics of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Receptors in Rat Brain. Peptides 3 : 669-677.
- Oliver C., Eskay R. L., Ben-Jonathan N. and Porter J. C. (1974) Distribution and Concentration of TRH in the Rat Brain. Endocrinology 95 (2) : 340-346.
- Ono H. and Fukuda H. (1982) Ventral Root Depolarization and Spinal Reflex Augmentation by a TRH Analog in Rat Spinal Cord. Neuropharmacology 21 : 739-744.
- Osbahr A. J., Nemeroff C. B., Luttinger D., Mason G. A. and Prange A. J. Jr. (1981) Neurotensin-induced antinociception in mice : Antagonism by Thyrotropin-releasing hormone. J. Pharmacol. Exp. Ther. 217 : 645-651.
- Pacheco H. F., McKelvy J. F., Woodward D. J., Loudes C., Joseph-Bravo P., Krulich L. and Griffin W. S. T. (1981a) TRH in the Rat Cerebellum : I. Distribution and Concentration. Peptides 2 (3) : 277-282.
- Pacheco H. F., Woodward D. J., McKelvy J. F. and Griffin W. A. (1981b) TRH in the Rat Cerebellum. II: Uptake by cerebellar slices. peptides 2 : 283.
- Padmanabhan V., Kesner J. S. and Convey E. H. (1981) Effects of Triiodothyronine and Thyroxine on Thyrotropin and Prolactin Secretion from Bovine Pituitary Cells in Vitro. Endocrinology 108 (1) : 226-231.
- Palkovits H. (1984) Topography of Chemically Identified Neurons in the Central Nervous System : Progress in 1981 - 1983. In : Neuroendocrine Perspectives (E. E. Müller and R. H. MacLeod, eds.), Vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 1-69.
- Parker C. R. Jr. (1981) Characterization of Immunoreactive Thyrotropin Releasing Hormone in Human Fetal Cerebellum. J. Neurochem. 37 (5) : 1266-1271.
- Parker C. R. Jr., Neaves W. B., Barnea A. and Porter J. C. (1977) Studies on the Uptake of <sup>3</sup>H-Thyrotropin releasing hormone and its metabolites by synaptosome preparations of the rat brain. Endocrinology 101 : 66.
- Pekary A. E. and Friedman S. (1983) Cycloheximide-Insensitive in Vitro

- Production of TRH-Homologous Peptide by Human Semen. The Endocrine Society 65 th Annual Meeting (Abstract No. 276).
- Pinnock R. D., Woodruff G. N. and Turnbull H. J. (1983) Actions of Substance P, MIF, TRH and Related Peptides in the Substantia Nigra, Caudate Nucleus and Nucleus Accumbens. *Neuropharmacology* 22 (6) : 687-696.
- Prange A. J. Jr., Nemeroff C. B., Loosen P. T., et al. (1979) Behavioral effects of thyrotropin-releasing hormone in animals and man : a review. In : *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and Other Peptides* (R. Collu et al., eds.), Raven Press, New York, pp. 75-96.
- Prasad C. and Peterkofsky A. (1976) Demonstration of Pyroglutamyl peptidase and amidase Activities toward Thyrotropin-releasing Hormone in Hamster Hypothalamic Extracts. *J. Biol. Chem.* 251 (11) : 3229:3234.
- Renaud L. P., Blume H. W., Fittman G. J., Lamour Y. and Tan A. T. (1979) Thyrotropin-Releasing Hormone Selectively Depresses Glutamate Excitation of Cerebral Cortical Neurons. *Science* 205 : 1275-1277.
- Richter K., Kawashima E., Egger R. and Kreil R. (1984) Biosynthesis of Thyrotropin Releasing Hormone in the skin of *Xenopus laevis* : partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. *The EMBO Journal* 3 : 617-621.
- Ridgway E. C., Klibanski A., Martorana M. A., Hilbury P., Kleffer J. D. and Chin W. W. (1983) The effect of somatostatin on the release of thyrotropin and its subunits from bovine anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 112 (6) : 1937-1942.
- Robbins R. and Reichlin S. (1982) In vitro systems for the study of secretion and synthesis of hypothalamic peptides. In : *Neuroendocrine Perspectives* (E. E. Müller and R. M. Macleod, eds.), Vol. 1, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 11-135.
- Ronning S. A., Heatley G. A. and Martin T. F. J. (1982) Thyrotropin-releasing Hormone Mobilizes Ca from endoplasmic reticulum and mitochondria of GH Pituitary Cells : Characterization of Cellular Ca Pools by a Method Based on Digitonin Permeabilization. *PNAS* 79 : 6294-6298.
- Rostene W. H., Morgat J. L., Dussailant M., Rainbows T. C., Sarrieau A., Vial H. and Rosselin G. (1984) In vitro Biochemical Characterization and autoradiographic Distribution of <sup>3</sup>H-Thyrotropin Releasing Hormone Binding Sites in Rat Brain. *Neuroendocrinology* 39 : 81-86.
- Rotsztein W. H., Charli J. L., Pattou E., Epelbaum J. and Kordon C. (1976) In vitro release of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) from rat mediobasal hypothalamus : effects of potassium, calcium and dopamine. *Endocrinology* 99 : 1663-1666.
- Rupnow J. H., Hinkle P. H. and Dixon J. E. (1979) A Macromolecule wich gives rise to Thyrotropin Releasing Hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89 : 721-728.
- Schally A. V., Coy D. H. and Meyers C. A. (1978) Hypothalamic Regulatory Hormones. *Ann. Rev. Biochem.* 47 : 89-128.

- Schally A. V., Redding T. W., Bowers C. Y. and Barrett J. F. (1969) Isolation and Properties of TRH. *J. Biol. Chem.* 244 : 4077.
- Schaeffer J. H., Axelrod J. and Brownstein M. J. (1977a) Regional differences in dopamine-mediated release of TRH-like material from synaptosomes. *Brain Res.* 138 : 571-574.
- Schaeffer J. H., Brownstein M. J. and Axelrod J. (1977b) Thyrotropin-Releasing Hormone-like material in the rat retina : changes due to environmental lighting. *PNAS* 74 (8) : 3579-3581.
- Scheffini G., Judd H. M. and MacLeod R. H. (1983) In Vitro Studies on Basal and Stimulated Prolactin Release by Rat Anterior Pituitary : A Possible Role for Calmodulin. *Endocrinology* 112 (1) : 64-70.
- Schmidt-Achert K. H., Askanas V. and Engel W. K. (1984) Thyrotropin-Releasing Hormone Enhances Choline acetyltransferase and Creatine Kinase in Cultured Spinal Ventral Horn Neurons. *J. Neurochem.* 43 (2) : 586-589.
- Sharp T., Bennett G. W. and Marsden C. A. (1982) Thyrotropin-Releasing Hormone Analogues Increase Dopamine Release from Slices of Rat Brain. *J. Neurochem.* 39 : 1763-1766.
- Sharp T., Tulloch I. F., Bennett G. W., Marsden C. A., Metcalf G. and Dettmar P. W. (1984) Analeptic Effects of Centrally Injected TRH and Analogues of TRH in the Pentobarbitone-Anaesthetized Rat. *Neuropharmacology* 23 : 339-348.
- Sheward W. J., Harmar A. J., Fraser H. M. and Fink G. (1983) Thyrotropin Releasing Hormone in Rat Pituitary Stalk Blood and Hypothalamus : Studies with High Performance Liquid Chromatography. *Endocrinology* 113 (5) : 1865-1869.
- Silverlsson H., Chang J. K., Folkers K. and Bowers C. Y. (1972) Synthesis of di- and tripeptides and assay in vivo for activity in the thyrotropin releasing hormone and luteinizing releasing hormone systems. *J. Med. Chem.* 15 : 8.
- Spindel E. R., Pettibone D. J. and Wurtman R. J. (1981) Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Content of Rat Striatum : Modification by Drugs and Lesions. *Brain Res.* 216 : 323-331.
- Spindel E. and Wurtman R. J. (1980) TRH Immunoreactivity in Rat Brain Regions, Spinal Cord and Pancreas : Validation by High-Pressure Liquid Chromatography and Thin-Layer Chromatography. *Brain Res.* 201 : 279-288.
- Spirles H. A., Plotnikoff H. P., Kostrzewa R. H., Marston C. T., Kastin A. J. and Christensen C. U. (1976) Possible association of increased rat behavioral effects and increased striatal dopamine and norepinephrine levels during the DOPA potentiation test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, Suppl. 1 : 121-124.
- Tapia-Arancibia L., Arancibia S. and Astier H. (1984)  $K^+$ -induced thyrotropin-releasing hormone release from superfused medlobasal hypothalamus in rats. Inhibition by somatostatin. *Neuroscience Letters* 45 (1) : 47-52.

- Tapia-Mancielba L. and Astier H. (1983) Opiate inhibition of  $K^+$ -induced TRH release from superfused mediobasal hypothalami in rats. *Neuroendocrinology* 37 : 166-168.
- Tashjian A. H., Barowsky N. J. and Jensen D. K. (1971) Thyrotropin Releasing Hormone : Direct Evidence for Stimulation of Prolactin Production by Pituitary Cells in Culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 : 516-523.
- Taylor R. L. and Burt D. R. (1981) Properties of  $^3H$ -(3-He-His)-TRH Binding to Apparent TRH Receptors in the Sheep Central Nervous System. *Brain Res.* 218 : 207-217.
- Taylor R. L. and Burt D. R. (1982) Species Differences in the Brain Regional Distribution of Receptor Binding for Thyrotropin Releasing Hormone. *J. Neurochem.* 38 : 1649-1656.
- Torres H., Charli J. L., Gonzalez-Noriega A., Vargas M. A. and Jopseh-Bravo P. (1986) Subcellular Distribution of the Enzymes Degrading Thyrotropin Releasing Hormone and Metabolites in Rat Brain. *Neurochemistry International* (in press).
- Vale W., Grant G. and Guillemin R. (1973) Chemistry of Hypothalamic Releasing Factors. In : *Frontiers in Neuroendocrinology* (U. F. Ganong and L. Martini, eds.), Oxford University Press, p. 375.
- Vizi E. S., Gyires K., Somogyi G. T. and Ungvary G. (1983) Evidence that Transmitter can be Released from Regions of the Nerve Cell other than the Presynaptic Axon Terminal : Axonal Release of Acetylcholine without Modulation. *Neuroscience* 10 : 967-972.
- Warberg J. (1982) Studies on the Release Mechanism for Hypothalamic Hormones. *Acta Endocrinol., Suppl.* 250 : 7-48.
- White J. D., Stewart K. D., Krause J. E. and McKelvy J. F. (1985) Biochemistry of Peptide-Secreting Neurons. *Physiological Reviews* 65 (3) : 533-606.
- Wilber J. F. and Seibel H. J. (1973) Thyrotropin-Releasing Hormone Interactions with an Anterior Pituitary Membrane Receptor. *Endocrinology* 92 : 888-893.
- Wilk S. and Friedman T. C. (1985) The effect of inhibitors of Prolyl Endopeptidase and Pyroglutamyl Peptide Hydrolase on TRH degradation in rat serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132 (2) : 787-794.
- Wilk S., Friedman T. C. and Wilk E. K. (1986) Purification and Properties of Rabbit Brain "Thyroliberinase", a membrane-bound Thyrotropin-Releasing Hormone degrading enzyme. *FASEB Abstract Form* (April 1986).
- Winokur H., Davis R. and Utiger R. D. (1977) Subcellular Distribution of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) in Rat Brain and Hypothalamus. *Brain Res.* 120 : 423-434.
- Winokur H. and Utiger R. D. (1974) Thyrotropin-Releasing Hormone : Regional Distribution in rat brain. *Science* 185 : 265-267.

- Winokur H. and Utiger R. D. (1979) Thyrotropin-Releasing Hormone in the Central Nervous System. : Distribution and Degradation. In : Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and Other Peptides (R. Collu et al., eds.), Vol. 1, Raven Press, New York, pp. 55.
- Yamauchi J. (1980) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) : Its Widespread Distribution in Discrete Hypothalamic Nuclei and Areas in Rat Brain. *Acta Medica Okayama* 34 (5) : 333-342.
- Yarbroough G. G. (1976) TRH potentiates excitatory actions of acetylcholine on cerebral cortical neurones. *Nature* 263 : 523-524.
- Yarbroough G. G. and Singh D. K. (1979) Effects of MK-771 on the isolated amphibian spinal cord : Comparison with Thyrotropin-Releasing Hormone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57 : 920-922.
- Yeluda S. and Kastin A. J. (1980) Peptides and Thermoregulation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 4 : 459-471.
- Youngblood W. W., Humm J. and Kizer J. S. (1979) TRH-like immunoreactivity in rat pancreas and eye, bovine and sheep pineals, and human placenta : non-identity with synthetic pyroglu-his-pro-NH<sub>2</sub> (TRH). *Brain Res.* 163 : 101-110.
- Youngblood W. W., Lipton H. H. and Kizer J. S. (1978) TRH-like immunoreactivity in urine, serum and extrahypothalamic brain : non-identity with synthetic pyroglu-his-pro-NH<sub>2</sub> (TRH). *Brain Res.* 151 : 99-116.



## APENDICE.

### 1.- Composición y preparación de líquido de cantelleo (Bray) para muestras acuosas.

Naftaleno	60.0	gr
PPO	4.0	gr
POPOP	0.2	gr
Metanol	100	ml
Etilenglicol	60	ml
Aforar a 1 l con Dioxano.		

Se disuelve el POPOP en dioxano, luego el PPO y finalmente el naftaleno. Se añaden el metanol y el etilenglicol y se deja agitando algunas horas. Finalmente se afora a 1 l con dioxano. El Bray se prepara y se guarda en botella ámbar.

### 2.- Composición y preparación del Reactivo de Pauli.

Solución I : 1 % ácido sulfanílico en 1 N HCl, a temperatura ambiente.

Solución II : 5 %  $\text{NaNO}_2$ , se prepara en el momento de usar y a 4°C.

Solución III : 15 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , a temperatura ambiente.

Se mezclan I y II 1:1 sobre hielo y se deja reposar de 3-5 min. La mezcla se aplica como spray a las placas y se seca con aire. Después se aplica III como spray y se seca con aire. Aparece una mancha roja-amarillenta que corresponde a TRH estándar. Es suficiente aplicar 4 µg para que el reactivo lo revele adecuadamente. El Reactivo de Pauli revela específicamente histidina.

### 3.- Composición de Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB).

NaCl	125	mM
KCl	4.4	mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.2	mM
$\text{H}_2\text{SO}_4$	1.3	mM
$\text{NaHCO}_3$	26	mM
glucosa	10	mM
$\text{CaCl}_2$	0.75	mM o 2.5 mM

El  $\text{CaCl}_2$  se añade al final para evitar precipitaciones. Para preparar KRB<sup>2</sup> con dosis depolarizantes de KCl, la concentración de éste se aumenta a 56 mM y la de NaCl se reduce a 73 mM para mantener la misma osmolaridad.

### 4.- Siliconización.

Para siliconizar material de vidrio o de plástico se prepara una solución al 5 % de un agente siliconizante (Surfasil) en acetona, justo antes de usarse. Ya que el agente es tóxico, la siliconización debe hacerse en campana y con guantes. El material se remoja en esta solución y se enjuaga exhaustivamente en agua corriente y después en

agua bidestilada 3 o 4 veces. El material se seca a 100° C para que el silicón endurezca.

5.- Buffer de RIA.

Fosfatos 0.05 M, pH 7.5

NaCl 150 mM

Albumina sérica bovina 0.25 % (grado RIA).

La albúmina se anade al final, Justo en el momento de usarse.

ABREVIATURAS.

Ach = Acetilcolina.  
ASB = Albúmina sérica de bovino.  
5-HT = Serotonina.  
DA = Dopamina.  
DAP = Diaminopeptidasa IV.  
DN-1417 =  $\gamma$ -butirolactona- $\gamma$ -carbonil-histidil-prolinamida.  
DTT = Ditiotreitól.  
EDTA = Acido etiléndiamino-tetra-acético.  
EGTA = Acido etilenglicol-bis-( $\beta$ -amino-etil éter)N,N'-tetra-acético.  
GABA = Acido  $\gamma$ -aminobutírico.  
H = Histamina.  
HIP = Histidil imido peptidasa.  
HPLC = Cromatografía Líquida de alta Presión.  
HP-TLC = Cromatografía en capa fina de alta resolución.  
IR = Inmunoreactividad.  
IP = Imidopeptidasa.  
KRB = Krebs-Ringer-Bicarbonato.  
L-DOPA = L-dihidroxifenilalanina.  
LHRH = Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante.  
MAO = Monoamino oxidasa.  
NA = Noradrenalina.  
PD = Prolina dipeptidasa.  
PGA = Piroglutamato aminopeptidasa.  
PIF = Factor inhibidor de la secreción de Prolactina.  
PPCE = "Post-Proline Cleaving Enzyme".  
PPDA = Post-prolin dipeptidil aminopeptidasa.  
RIA = Radioinmunoensayo.  
SNC = Sistema Nervioso Central.  
SRIF = Somatostatina.  
TFA = Acido Trifluoroacético.  
TLC = Cromatografía en capa fina.  
TRH = Hormona Liberadora de Tirotropina.  
TSH = Hormona Estimulante de la Tiroides (Tirotropina).  
T<sub>3</sub> = Triiodotironina.  
T<sub>4</sub> = Tiroxina.